WO9951743

Translation from Japanese of the Field of the Invention Date of publication: 14.10 1999

Translated by NBT

The present invention relates to a human/mouse chimera antibody comprising a variable region (V region) of a mouse monoclonal antibody against human tissue factor (TF) and a constant region (C region) of a human antibody, a humanized antibody wherein a complementarity-determining region (CDR) of a light chain (L chain) V region and a heavy chain (H chain) V region of a mouse monoclonal antibody against human TF is grafted into a human antibody, an L chain and an H chain of the antibody, and a fragment of a V region which constitutes an L chain or an H chain of the antibody. The invention also relates to a process for constructing a humanized antibody against human TF.

The invention further relates to a DNA encoding the above-mentioned antibody, particularly a fragment of its V region, and a DNA encoding an L chain or H chain containing the V region. The invention also relates to a recombinant vector containing the DNA and a host transformed with the vector.

The invention further relates to a process for producing a chimera antibody against human TF and a humanized antibody. The invention also relates to a pharmaceutical composition containing a humanized antibody against human TF as an effective ingredient and a medicament for treating disseminated intravascular coagulation (DIC).

Translation of Claims

1. A chimera H chain comprising a heavy (H) chain variable (V) region of a mouse monoclonal antibody against human tissue factor (TF) and an H chain constant (C) region of a human antibody, wherein said H chain V region has any amino acid sequence of

- (1) an amino acid sequence of SEQ ID NO:139 (ATR-2),
- (2) an amino acid sequence of SEQ ID NO:140 (ATR-3),
- (3) an amino acid sequence of SEQ ID NO:141 (ATR-4),
- (4) an amino acid sequence of SEQ ID NO:142 (ATR-5),
- (5) an amino acid sequence of SEQ ID NO:143 (ATR-7), and
- (6) an amino acid sequence of SEQ ID NO:144 (ATR-8).
- The chimera H chain according to claim 1, wherein said H chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:142.
- The chimera H chain according to claim 1 or 2, wherein said H chain C region is a Cγ1, Cγ2,
 Cγ3 or Cγ4 region.
- 4. The chimera H chain according to any one of claims 1 to 3, wherein said H chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:142, and said H chain C region is Cγ4.
- 5. A chimera L chain comprising a light (L) chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and an L chain C region of a human antibody, wherein said L chain V region has any amino acid sequence of:
 - (1) an amino acid sequence of SEQ ID NO:145 (ATR-2),
 - (2) an amino acid sequence of SEQ ID NO:146 (ATR-3),
 - (3) an amino acid sequence of SEQ ID NO:147 (ATR-4),
 - (4) an amino acid sequence of SEQ ID NO:148 (ATR-5),
 - (5) an amino acid sequence of SEQ ID NO:149 (ATR-7), and
 - (6) an amino acid sequence of SEQ ID NO:150 (ATR-8).
- The chimera L chain according to claim 5, wherein said L chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:148.
- 7. The chimera L chain according to claim 5 or 6, wherein said L chain C region is a $C\lambda$ or $C\kappa$ region.

- 8. The chimera L chain according to any one of claims 5 to 7, wherein said L chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:148, and said L chain C region is Cκ.
- A chimera antibody against human TF comprising the chimera H chain according to any one of claims 1 to 4 and the chimera L chain according to any one of claims 5 to 8.
- 10. A chimera antibody against human TF comprising the chimera H chain according to claim4 and the chimera L chain according to claim 8.
- 11. A humanized H chain V region comprising a complementarity-determining region (CDR) of an H chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and a framework region (FR) of an H chain V region of a human antibody, wherein said CDR has the following amino acid sequences:

H-CDR1: Asp Tyr Tyr Met His (SEQ ID NO:133)

H-CDR2: Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly (SEQ ID NO:134)

H-CDR3: Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:135).

12. A humanized H chain V region, wherein said FR has the following amino acid sequences:

H-FR1: Gin Val Gin Leu Leu Giu Ser Giy Ala Val Leu Ala Arg Pro Giy Thr Ser Val Lys Ile Ser

Cys Lys Ala Ser Giy Phe Asn Ile Lys (SEQ ID NO:110)

H-FR2: any of the following sequences (1) to (3):

- (1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp I1e Gly (SEQ ID NO:111)
- (2) Try Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly (SEQ ID NO:112)
- (3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (SEQ ID NO:113)

 H-FR3: any of the following sequences (1) to (10):
- (1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:114)
- (2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:115)

- (3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala

 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:116)
- (4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:117)
- (5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu
 Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:118)
- (6) Arg Val Thr IIe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:119)
- (7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg (SEQ ID NO:120)
- (8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gin Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala IIe Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:121)
- (9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:122)
- (10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:123)
- FR4: Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser (SEQ ID NO:124).
- 13. The humanized H chain V region according to claim 11 or 12, which has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:30 (version a), SEQ ID NO:40 (version b), SEQ ID NO:42 (version c), SEQ ID NO:50 (version d), SEQ ID NO:52 (version e), SEQ ID NO:58 (version f), SEQ ID NO:60 (version g), SEQ ID NO:64 (version h), SEQ ID NO:70 (version i), SEQ ID NO:72 (version j), SEQ ID NO:76 (version b1), SEQ ID NO:78 (version d1), SEQ ID NO:82 (version b3) or SEQ ID NO:84 (version d3).
- 14. The humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 13, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:40 (version b).

- 15. The humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 13, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:70 (version i).
- 16. A humanized L chain V region comprising a CDR of an L chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and an FR of a human L chain V region, wherein said CDR has the following amino acid sequences:

L-CDR1: Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser (SEQ ID NO:136)

L-CDR2: Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (SEQ ID NO:137)

L-CDR3: Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (SEQ ID NO:138).

- 17. The humanized L chain V region according to claim 16, wherein said FR has the following amino acid sequences:
 - L-FR1: Asp Ile Gin Met Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

 Cys (SEQ ID NO:125)

L-FR2: any of the following sequences (1) to (3):

- (1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu lle Tyr (SEQ ID NO:126)
- (2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu IIe Tyr (SEQ ID NO:127)
- (3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu IIe Tyr (SEQ ID NO:128)

L-FR3: any of the following sequences (1) to (3):

- (1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:129)
- (2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:130)
- (3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:131)

L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lle Lys (SEQ ID NO:132).

- 18. The humanized L chain V region according to claim 16 or 17, which has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:93 (version a), SEQ ID NO:99 (version b), SEQ ID NO:101 (version c), SEQ ID NO:107 (version b1) or SEQ ID NO:109 (version b2).
- 19. The humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 18, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:99 (version b).
- 20. The humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 18, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:109 (version b2).
- 21. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 15 and an H chain C region of a human antibody.
- 22. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region (version b) according to claim 14 and an H chain C region of a human antibody.
- 23. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region (version i) according to claim 15 and an H chain C region of a human antibody.
- 24. The humanized H chain according to any one of claims 21 to 23, wherein said H chain C region of a human antibody is Cy1, Cy2, Cy3 or Cy4.
- 25. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 20 and an L chain C region of a human antibody.
- 26. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region (version b) according to claim 19 and an L chain C region of a human antibody.
- 27. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region (version b2) according to claim 20 and an L chain C region of a human antibody.
- 28. The humanized L chain according to any one of claims 25 to 27, wherein said L chain C region of a human antibody is $C\lambda$ or $C\kappa$.
- 29. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain according to any one of claims 21 to 24 and the humanized L chain according to any one of claims 25 to 28.

- 31. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain (version i) according to claim 23 and the humanized L chain (version b) according to claim 26.
- 32. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain (version i) according to claim 23 and the humanized L chain (version b2) according to claim 27.
 - 33. A DNA encoding the chimera H chain according to any one of claims 1 to 4.
 - 34. A DNA encoding the chimera H chain according to any one of claims 2 to 4.
 - 35. A DNA encoding the chimera L chain according to any one of claims 5 to 8.
 - 36. A DNA encoding the chimera L chain according to any one of claims 6 to 8.
 - 37. A DNA encoding the humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 15.
 - 38. A DNA encoding the humanized H chain V region (version b) according to claim 14.
 - 39. A DNA encoding the humanized H chain V region (version i) according to claim 15.
 - 40. A DNA encoding the humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 20.
 - 41. A DNA encoding the humanized L chain V region (version b) according to claim 19.
 - 42. A DNA encoding the humanized L chain V region (version b2) according to claim 20.
 - 43. A DNA encoding the humanized H chain according to any one of claims 21 to 24.
 - 44. A DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 22 or 24.
 - 45. A DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 23 or 24.
 - 46. A DNA encoding the humanized L chain according to any one of claims 25 to 28.
 - 47. A DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 26 or 28.
 - 48. A DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 27 or 28.
- 49. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 33.

- 50. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 34.
- 51. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 35.
- 52. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 36.
- 53. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 33 and the DNA encoding the chimera L chain according to claim 35.
- 54. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 34 and the DNA encoding the chimera L chain according to claim 36.
- 55. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 43.
- 56. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 44.
- 57. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45.
- 58. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain according to claim 46.
- 59. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 47.
- 60. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 48.
- 61. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 43 and the DNA encoding the humanized L chain according to claim 46.

- 62. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 44 and the DNA encoding the humanized L chain (version h) according to claim 47.
- 63. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45 and the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 47.
- 64. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45 and the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 48.
- 65. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 49 and the expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 51.
- 66. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 50 and the expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 52.
 - 67. A host transformed with the expression vector according to claim 53.
 - 68. A host transformed with the expression vector according to claim 54.
- 69. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 55 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain according to claim 58.
- 70. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 56 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 59.
- 71. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 57 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 59.

- 72. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 57 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 6.
 - 73. A host transformed with the expression vector according to claim 61.
 - 74. A host transformed with the expression vector according to claim 62.
 - 75. A host transformed with the expression vector according to claim 63.
 - 76. A host transformed with the expression vector according to claim 64.
- 77. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 65 and collecting a chimera antibody from said culture product.
- 78. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 66 and collecting a chimera antibody from said culture product.
- 79. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 67 and collecting a chimera antibody from said culture product.
- 80. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 68 and collecting a chimera antibody from said culture product.
- 81. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 69 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 82. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 70 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 83. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 71 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 84. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 72 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 85. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 73 and collecting a humanized antibody from said culture product.

- 86. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 74 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 87. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 75 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 88. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 76 and collecting a humanized antibody from said culture product.
- 89. A process for producing a natural humanized antibody having a complementarity-determining region (CDR) derived from a non-human origin and a framework region (FR) derived from a natural human antibody and possessing reduced immunogenicity, which comprises:
 - (1) preparing a non-human monoclonal antibody reactive to an aimed antigen,
- (2) preparing plural human antibodies having a high homology to the amino acid sequence of FR in the monoclonal antibody of said (1),
- (3) constructing a first humanized antibody by substituting four FRs of one kind of the human antibody in said (2) with corresponding FRs of the non-human monoclonal antibody said (1),
- (4) measuring a binding capacity of the humanized antibody constructed in said (3) toward the antigen or an ability of the antibody to neutralize the biological activity of the antigen,
- (5) constructing a second humanized antibody by substituting one to three FRs of the humanized antibody constructed in said (3) with corresponding FRs of the human antibody different from that used in (3) among the human antibodies prepared in (2),
- (6) comparing the second humanized antibody constructed in said (5) and the first humanized antibody obtained in said (3) in view of the binding capacity toward the antigen or the ability to neutralize the biological activity of the antigen, and selecting a humanized antibody exhibiting a preferable activity,
- (7) carrying out the steps of said (3) to (6) upon the humanized antibody selected in said (6), and

- (8) repeating the steps of said (3) to (6) until a humanized antibody having an activity equal to that of the non-human monoclonal antibody in said (1).
- 90. The process according to claim 89, wherein said aimed antigen is a human tissue factor (TF).
 - 91. A humanized antibody obtainable through the process of claim 89.
 - 92. A humanized antibody obtainable through the process of claim 90.
- 93. A medicament for treating disseminated intravascular coagulation (DIC) comprising the humanized antigen according to any one of claims 29 to 32 and 92.

PCT

国際事務局 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

世界知的所有権機関



(51) 国際特許分類6 C12N 15/13, C12P 21/08, C12N 5/10

(11) 国際公開番号 A1 WO99/51743

(43) 国際公開日

1999年10月14日(14.10.99)

(21) 国際出願番号

PCT/JP99/01768

(22) 国際出願日

1999年4月2日(02.04.99)

(30) 優先権データ

特願平10/91850

1998年4月3日(03.04.98) JF

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)

中外製薬株式会社

(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP]

〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)

佐藤 功(SATO, Koh)[JP/JP]

安達秀樹(ADACHI, Hideki)[JP/JP]

薮田尚弘(YABUTA, Naohiro)[JP/JP]

〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地

中外製薬株式会社内 Sizuoka, (JP)

(74) 代理人

石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.)

〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号

虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類

国際調査報告書

(54)Title: HUMANIZED ANTIBODY AGAINST HUMAN TISSUE FACTOR (TF) AND PROCESS FOR CONSTRUCTING HUMANIZED ANTIBODY

(54)発明の名称 ヒト組織因子 (TF) に対するヒト型化抗体およびヒト型化抗体の作製方法

(57) Abstract

A humanized antibody against tissue factor (TF) which comprises: A. a humanized H chain containing (1) an H chain V region containing the H chain CDR of a mouse monoclonal antibody against TF and the H chain FR of a human antibody, and (2) the H chain C region of a human antibody; and B. a humanized L chain containing (1) an L chain V region containing the L chain CDR of a mouse monoclonal antibody against TF and the L chain FR of a human antibody, and (2) the L chain C region of a human antibody. The mouse monoclonal antibody CDR is grafted into the human antibody to construct the humanized V region. Next, the FR thereof is replaced by the corresponding FR of another human antibody with a high homology, thus detecting a highly active humanized antibody.

A. (1)組織因子(TF)に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRとヒト抗体のH鎖FRとを含んで成るH鎖V領域、及び(2)ヒト抗体H鎖C領域、を含んで成るヒト型化H鎖;並びにB. (1)TFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRとヒト抗体のL鎖FRとを含んで成るL鎖V領域、及び(2)ヒト抗体し鎖C領域、を含んで成るヒト型化L鎖;を含んで成る、TFに対するヒト型化抗体。

ヒト抗体にマウスモノクローナル抗体のCDRをグラフトすることによりヒト型化V領域を作製した後、そのFRを相同性の高い他のヒト抗体の対応するFRで置換することにより活性の高いヒト型化抗体を探索する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

アラブ首長国連邦 アルバニア アルメニア オーストリア オーストラリア オーストラリア オーストラリン ボズニア・ヘルツェゴビナ バルバドス DM EE FI FR KZ LC LI スーダン スウェーデン シンガポール DEGIKLNZDGJZMRTAGSZNUAW AAAABBBEFGJRYAFGHIMNRUYZEK ĽŔ GGGGGGGGGHHIIIIIIIIJKKK LLUV ACDGK セネガル スワジランド チャード タジキスタン タンザニア ァンサニア トルクメニスタン トルコ ドリニダッド・トバゴ ウクライナ ウガンダ 共和国 マリ モンゴル MNRWXELOZLTO NNRPPO モモマメニオノニポポルタイコーダウ・ンガリウシェンルーラトマーニール エジドルアトマ エン・ンガニアトマー・ンガニア スイス スイス コートジボアール カメルーン 中国 コスタ・リカ リガンタ 米国 ガベキスタン ヴィィゴースラビア 南アフリカ共和国 ジンパブエ コキュア・バス キプロス チェッツ デンマーク ーランド KR

明細書

ヒト組織因子(TF)に対するヒト型化抗体およびヒト型化抗体の 作製方法

発明の分野

本発明は、ヒト組織因子(TF)に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域(V領域)とヒト抗体の定常領域(C領域)とからなるヒト/マウスキメラ抗体、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖(L鎖)V領域及び重鎖(H鎖)V領域の相捕性決定領域(CDR)がヒト抗体に移植されているヒト型化(humanized)抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法に関する。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAに関する。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。

本発明はさらに、ヒトTFに対するキメラ抗体及びヒト型化抗体の製造方法に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群(DIC)治療薬に関する。

背景技術

組織因子(TF)は、細胞表面に発現される凝固第VII因子受容体であり、凝固第VII因子との複合体形成を通じて、凝固第IX因子およびX因子の活性化に不可欠な役割を担っており、血液凝

固反応の実質的な開始因子と位置づけられている。

TFは血管を構成する線維芽細胞や平滑筋細胞などに発現されており、血管損傷の際に凝固系を活性化して止血機能を果たすことが知られている。

DICは、血管内での凝固系の活性化によって全身の主として細小血管内に血栓が多発する疾患である。血小板や凝固因子が消費されて低下することにより、血栓とは逆の現象である出血を生じることも少なくない。また多発した微小血栓により重要臓器の微小循環不全をきたし、一旦発症すると不可逆的な機能障害を残すことも多く、DICの予後が不良となるため、重要な疾患と認識されている。

厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班平成2年度および4年度の研究報告書から推定される基礎疾患の割合は、造血器悪性腫瘍が約30%、固形癌約20%、感染症約15%、産科的疾患約10%、肝疾患6%、ショック5%、心血管系疾患3%である。またDICの発症頻度は白血病が約15%、悪性リンパ種が6~7%と高く、固形癌では3%程度である。

これら種々の疾患に合併してDICは発症するが、その原因物質は共通であり、それがTFである。すなわち、急性白血病や悪性リンパ腫、固形癌においては腫瘍細胞のTFの生成・発現の異常亢進、感染症(特にグラム陰性菌性敗血症)においては単球・血管内皮細胞におけるTF産生・発現の亢進、劇症肝炎では壊死した肝組織からのTFの血中への流入、大動脈瘤・心臓瘤・巨大血管腫では血管内面でのTF形成、また産科的疾患(羊水栓塞・常位胎盤早期剝離)や手術・外傷・火傷においてもTFの血中への流入がDICの発症機序と考えられている。

原疾患(基礎疾患)の治療が第一であるが、実際にはこれが容易

ではない。

現状のDIC治療法としては、抗凝固療法と補充療法が行われている。抗凝固療法の中心となっているのはヘパリン製剤(未分画ヘパリン、低分子ヘパリン)であり、合成蛋白分解酵素阻害剤(メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタット)や濃縮血漿製剤(アンチトロンビンIII、活性化プロテインC製剤)も用いられている。補充療法としては濃縮血小板血漿や新鮮凍結血漿(フィブリンの補給)、洗浄赤血球等がある。

しかし現状の治療薬では、有効性や副作用の面で十分に満足できるものはなく、DICからの完全離脱が出来ない場合がほとんどであることより、治療効果が高く副作用の少ない薬剤の使用が期待されている。

一方、新しいDIC治療の試みとしては、トロンボモジュリン製剤やヒルジン、抗PAF剤がある。TFPI(Tissue Factor Pathway Inhibitor)や、FXa選択的阻害剤が経口投与可能な抗凝固・抗血栓剤として注目を集めている。また、TFの活性を中和するものとして、WO88/07543には、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体が、WO96/40921には、ヒト型化抗ヒトTF抗体として開示されている。

マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体は、DICに於いて主薬効に伴う出血傾向などを示さない安全で有効な治療薬となることが期待できる。しかしながら、マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性(「抗原性」という場合もある)を有し、このため、ヒトにおけるマウスモノクローナル抗体の医学療法的価値は制限されている。例えば、マウス抗体をヒトに投与すると異物として代謝されうるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を充分に発揮できない。さらに、投与したマウ

ス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体(HAMA)は、血清病 又は他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応 答を惹起する。したがって、マウスモノクローナル抗体をヒトに頻 回投与することはできない。

これらの問題を解決するため、非ヒト由来の抗体、例えばマウス 由来のモノクローナル抗体の免疫原性を低減させる方法が開発され た。その一つが、抗体の可変領域(V領域)はもとのマウスモノク ローナル抗体に由来し、定常領域(C領域)は適当なヒト抗体に由 来するキメラ抗体を作製する方法である。

得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の可変領域を完全な形で含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来するアミノ酸配列の比率が実質的に滅少しており、それ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想されるが、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある(LoBuglio, A., F. らProc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989)。

マウス抗体の免疫原性を低減させるための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させることが期待される。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域(complementarity determining region; CDR)のみをヒト可変領域に移植して「再構成」(reshaped)ヒト可変領域を作製する。ただし、必要によっては、再構成ヒト可変領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているフレームワーク領域(FR)の一部のアミノ酸配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒ

4

ト以外のアミノ酸配列に由来する部分は、CDR及び極く一部のFRのみである。CDRは超可変アミノ酸配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。

ヒト型化抗体については、さらに、 Riechmann, L. らNature, 33 2, 323-327, 1988; Verhoeye, M. らScience, 239, 1534-1536, 199 8; Kettleborough, C. A. ら Protein Engng., 4, 773-783, 1991; M aeda, H., Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest. P. R., Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Cater, P. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. ら J. Immu nol., 148, 1149-1154, 1992; 及びSato, K., ら Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと。

従来のヒト型化技術では、フレームワーク領域(FR)の一部にマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植されたアミノ酸配列を含む。そのため、ヒトにおいて治療薬として投与した場合に、可変領域の一ないし数アミノ酸ではあるが、ヒトに存在しないアミノ酸配列を有する部位に対する抗体ができる危険性が存在する。この危険性を回避するために、第三のヒト型化技術を考案した。すなわち、三個のCDRの立体構造を保持するために必要な四個のFR(FR1~4)について、一つのFRを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のFRと相同性の高いヒト抗体のFRを置換する方法である。この際、データベース上に存在するヒト抗体がら数種類のFRを選択し、順次置換(shuffle)することにより活性の高いヒト型化抗体の作製を行う。

こうすることにより、可変領域の中でCDRを除くFRは、全て ヒト抗体由来のアミノ酸配列を有するヒト型化抗体を作製すること

が出来る。このため、マウスCDRを担持するヒト型化抗体は、もはやヒトCDRを含有するヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

前記のごとく、ヒト型化抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒト型化抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、中和活性を示すヒト型化抗体を作製するためには種々の工夫が必要である(例えば、Sato, K.ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと)。

発明の開示

本発明は、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域(V領域)とヒト抗体の定常領域(C領域)とからなるヒト/マウスキメラ抗体、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖(L鎖)V領域及び重鎖(H鎖)V領域の相捕性決定領域がヒト抗体に移植されているヒト型化(humanized) 抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法を提供することを目的とする。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域の断片を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAを提供することを目的とする。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及ぶ該ベクターにより形質転換された宿主を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群(DIC)治療薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒト

TFに対するマウスモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性が 低減されている抗体を得ることに成功し、また、新しいヒト型化抗 体の作製方法を開発し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ヒト抗体のH鎖C領域、及びヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片を含むキメラH鎖に関する。H鎖V領域としては、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、C領域としてはC γ 4 領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト抗体のL鎖C領域、及びヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の断片を含むキメラL鎖に関する。L鎖V領域としては、配列番号15で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、L鎖C領域としてはCκ領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖及びキメラL鎖を含む、ヒト TFに対するヒトマウスキメラモノクローナル抗体に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域(FR)1~4、及びヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の相補性決定領域(CDR)1~3を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片に関する。CDR1~3としては、それぞれ配列番号133~135で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のH鎖V領域FR1との相同性が40%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のH鎖V領域FR2との相同性が40%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のH鎖V領域FR4との相同性が40%以上のヒト抗体FR3が挙げられる。

好ましくは、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のH鎖V領域FR1との相同性が50%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のH鎖V領域FR2との相同性が70%以上のヒト抗体FR2が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のH鎖V領域FR3との相同性が65%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のH鎖V領域FR3との相同性が80%以上のヒト抗体FR4が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L39130、ヒト抗体L80844、ビト抗体L04345、ヒト抗体S78322、ヒト抗体 226827、ヒト抗体U95239およびヒト抗体L03147が挙げられ、FR4としては、ヒト抗体L39130が挙げられる

好ましい例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR2としては、ヒト抗体L39130、およびヒト抗体のZ80844が挙げられ、FR3としては、ヒト抗体Z34963、ヒト抗体M62723およびヒト抗体U95239が挙げられ、FR4としてヒト抗体L39130が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR2としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR3としては、ヒト抗体 Z34963およびヒト抗体U95239が挙げられ、FR4としてヒト抗体L39130が挙げられる。

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号としてKaba

tの規定(Kabat, E.A.ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。

さらに、本発明は、配列番号30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82、84で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体のL鎖V領域のFR1~4、及びヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR1~3を含む、ヒト型化抗体のL鎖V領域の断片に関する。CDR1~3としては、それぞれ配列番号136~138で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体のL鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のL鎖V領域FR1との相同性が40%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のL鎖V領域FR2との相同性が40%以上のヒト抗体FR2が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のL鎖V領域FR3との相同性が40%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR4としては、マウス抗体のL鎖V領域FR3との相同性が40%以上のヒト抗体FR4が挙げられる。

好ましくは、ヒト抗体のL鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のL鎖V領域FR1との相同性が75%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のL鎖V領域FR2との相同性が80%以上のヒト抗体FR2が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のL鎖V領域FR3との相同性が70%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR4としては、マウス抗体のL鎖V領域FR4との相同性が80%以上のヒト抗体FR4が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体のL鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体237332

およびヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 および P 0 1 6 0 7 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体のL鎖 V 領域のF R 1 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号としてKaba tの規定(Kabat, B.A.ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。

さらに、本発明は、配列番号93、99、101、107又は109で表されるアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体のL鎖V領域の断片に関する。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片及びヒト抗体のH鎖C領域の断片を含む、ヒトTFに対するヒト型化抗体のH鎖に関する。ここで、C領域としてはC γ 4 領域、ヒト抗体由来のFR1~4 としては、それぞれヒト抗体L39130(FR1)、ヒト抗体L39130(FR2)、ヒト抗体Z34963(FR3)またはヒト抗体U95239(FR3)、ヒト抗体L39130(FR4)由来のもの、そしてCDR1~3としてはそれぞれ配列番号133~135で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖V領域の断片及びヒト抗体のL鎖C領域の断片を含む、ヒトTFに対するヒト型化抗体のL鎖に関する。ここで、C領域としてはCκ領域、ヒト抗体由来のFR1~4としては、それぞれヒト抗体Z37332(FR1)、ヒト抗体X93625(FR2)、ヒト抗体S68699(FR

3)、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 (F R 4) 由来のもの、そして C D R 1 ~ 3 としてはそれぞれ配列番号 1 3 6 ~ 1 3 8 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖及びH鎖を含む、ヒトTFに対するヒト型化抗体に関する。

さらに、本発明は、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法に 関する。ヒト型化の作製方法とは、H鎖またはL鎖の抗原認識部位 であるCDR1~3の構造を支えるFR1~4の選択方法に関する 。すなわち、各FRを一つの単位として、マウス抗体由来のFRと 相同性の高いヒト抗体のFRを複数選択し、そのFRを順次置換(shuffle)して所望の活性を有するヒト型化抗体の作製方法 に関する。

さらに詳しくは、本発明のヒト型化抗体の製造方法の一例においては、非ヒト由来の相補性決定領域(CDR)及び天然ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)を有する免疫原性を低減させた天然ヒト型化抗体の製造方法において、

- (1)目的とする抗原に対して反応性の非ヒトモノクローナル抗体を用意し、
- (2)前記(1)のモノクローナル抗体中のFRのアミノ酸配列に対して高い相同性を有するヒト抗体を複数用意し、
- (3)前記(2)における1種類のヒト抗体の4個のFRを前記(1)の非ヒトモノクローナル抗体の対応するFRにより置換して第一のヒト型化抗体を作製し、
- (4)前記(3)において作製したヒト型化抗体の抗原への結合 性又は抗原の生物活性を中和する能力を測定し、
- (5)前記(3)において作製したヒト型化抗体中の1~3個の FRを、(2)で用意したヒト抗体の内、(3)で使用したものと

は異なるヒト抗体の対応するFRにより置換して第二のヒト型化抗 体を作製し、

- (6)前記(5)で作製した第二のヒト型化抗体と前記(3)で得た第一のヒト型化抗体とを、抗原に対する結合性、又は抗原の生物活性を中和する能力について比較し、好都合な活性を示すヒト型化抗体を選択し、
- (7)前記(6)で選択されたヒト型化抗体について、前記(3)~(6)の段階を実施し、そして
- (8)前記(1)における非ヒトモノクローナル抗体と同等の活性を有するヒト型化抗体が得られるまで前記(3)~(6)の段階を反復する、

ことを特徴とする。

ヒトTFに対する中和活性をある程度有するヒト型化抗体が得られれば、そのH鎖及びL鎖のV領域の特定のFRに対してさらに相同性の検索を行い、さらに相同性の高いヒト抗体を選択することが出来る。ここで得られたヒト抗体を上記の工程(2)の複数のヒト抗体群に加えて、さらに工程(3)~(6)を反復し、所望の活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

さらに、本発明は、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコードするDNAに関する。H鎖V領域の断片及びL鎖V領域の断片のアミノ酸配列及びDNAとしては、それぞれ配列番号9又は15で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖又はキメラL鎖をコードする DNAに関する。該H鎖をコードするDNAとしては例えば配列番号9で表される塩基配列を含むものが挙げられ、該L鎖をコードするDNAとしては配列番号15で表される塩基配列を含むものが挙

げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコードするDNAに関する。H鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられ、L鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト型化抗体のH鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82又は84で表されるいずれかのアミノ酸配列をコードするDNAを含む、ヒト型化抗体のH鎖DNAに関する。該DNAとしては、配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号93、99、101、107又は109で表されるアミノ酸配列をコードする、ヒト型化抗体のL鎖DNAである。該DNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記いずれかのDNAを含む組換えベクター に関する。

さらに、本発明は、前記組換えベクターにより形質転換された形質転換体に関する。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を採取することを特徴とするヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体の製造方法に関する。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬 組成物又はDIC治療剤に関する。

図面の簡単な説明

図1は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化 a バージョン/L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化 a バージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図2は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化αバージョン/L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化αバージョン抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図3は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化 a バージョン/L鎖ヒト型化 a バージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図4は、抗-TF-マウスモノクローナル抗体ATR-5、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンa/L鎖ヒト型化バージョン a 抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図5は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型 化バージョンa抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図6は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン c/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd/L鎖キメラ 抗体の抗原結合活性を測定したグラフである。

図7は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンc/L鎖キメラ抗体 、H鎖ヒト型化バージョンd/L鎖キメラ抗体の、ヒトTFに対す る中和活性を比較したグラフである。

図8は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンa抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図9は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ/L鎖ヒト型 化バージョンb抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンc 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図10は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンc抗体の、ヒトTFに対する中和活性の比較を示すグラフである。

図11は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンc抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図12は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンc抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図13は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図14は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョ

ンd/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図15は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンe/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンe/L鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図16は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンe/L鎖キメラ抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図17は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンg/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図18は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンg/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図19は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb3/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図20は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb3/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図21は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンj/L鎖キメラ抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図22は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョ

ンj/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図23は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンj/L鎖キメラ抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図24は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンj/L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図25は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンb1抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図26は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンb1抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図27は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図28は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンb /L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb /L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性 を比較したグラフである。

図29は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb 1 抗体、及びH鎖ヒト型化バージ

ョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図30は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb1抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図31は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図32は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性(TFのファクターXa産生阻害活性)を比較したグラフである。

図33は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性(ファクターX結合阻害活性)を比較したグラフである。

図34は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンb2抗体の、ヒトTFに対する中和活性(TFの血漿凝固阻害活性)を比較したグラフである。

図35は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンb抗体、H鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョンi/L鎖ヒト型化バージョン i/L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の各種条件で処理したヒトTFへの反応性を比較した図である。

発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

1. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の作製

TFに対するマウスモノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマからTF活性を特異的に阻害する抗体を産生するクローンを選択することにより調製される。

すなわち、ヒト胎盤より精製したTFを抗原として免疫したマウスの脾細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは、抗体のTFとの結合能はTF高発現細胞株J82を用いたCell-ELISAで、TFに対する中和能は凝固第X因子(Factor X:FX)の活性化に対する阻害活性を指標にした測定系で行った。その結果、TF/VIIa複合体のFX活性化を強く阻害する抗体6種を産生するハイブリドーマの樹立に成功した。

(1)抗原の調製

動物の免疫に用いるTFとしては、組換えDNA法又は化学合成により調製したTFのアミノ酸配列の一部のペプチド、又はヒト胎盤由来のTFなどが挙げられる。例えば、Itoらの方法(Ito T.ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993) に準じて行い精製したヒト胎

盤由来のTFを抗原として用いることができる。

得られたヒトTFは、アジュバントと混合し抗原として用いる。 アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント の不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものを混合し てもよい。

(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた抗原を非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4~21日間間隔で免疫する。

最終の免疫日から2~3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、0.1~100μgが用いられる。

(3) 抗体価の測定

免疫した動物の免疫応答レベルを確認し、また、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択するため、免疫した動物の血中抗体価、又は抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する。

抗体検出の方法としては、公知技術、例えばEIA(エンザイムイムノアッセイ)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素連結イムノソルベントアッセイ)等が挙げられる。

(4)細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ(骨髄腫)細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手

可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばHAT培地)で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)培地に生育できないものである。

ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x6 3Ag8.653)(J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979), P3x63Ag8.1 (Current Topics in Micro biology and Immunology, 81, 1-7, 1978), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. 6, 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D. H. Cell, 8, 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, M. らNature, 276, 269-270, 1978), F0 (de St. Groth, S. F. ら J. Immunol. Methods, 35, 1-21, 1980), S194 (Trowbride, I. S., J. Exp. Med., 148, 313-323, 1978), R210 (GGalfre, G. ら Nature, 277, 131-133, 1979) 等が好適に使用される。

抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出又は採取し、これら組織を破砕する。得られる破砕物をPBS、DMEM、RPMI1640等の培地又は緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体産生細胞を調製する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。 細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1~1:10で融合促進剤の存在下、30~37℃で1~15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるた

めには、平均分子量1,000~6,000のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(5) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地(HAT培地など)を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セル ソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブ リドーマを取得する。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、種々の測定系を組み合わせて行うことが出来る。例えば、CellーELISAのごとき抗原認識測定系やFactor Xa活性を指標としたTF中和活性測定系、血漿凝固阻害活性測定系のごとき中和活性測定系を組み合わせて所望の活性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。このようにして、例えば、ATRー2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7およびATR-8のごときモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得することが出来る。

(6) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法

としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10~20%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地、DMEM培地、又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37℃,5%CO2濃度)で2~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に 増殖させる。そして、1~4週間後に腹水又は血清を採取する。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製する。

2. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコード するDNAのクローニング

(i) m R N A の調製

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖V 領域をコードするDNAのクローニングを行うため、回収されたハ イブリドーマから公知の方法、例えばグアニジンー超遠心法(Chir gwin, J. M. ら、Biochemistry, (1979), 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, Pら(1987), 162, 156-159)等により全RNAを調製 し、mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech)に添付されたオ リゴ (dT) ーセルロース スパンカラム等によりmRNAを調製 する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biote ch)を用いることにより、全RNAの抽出操作を経ずに、mRNA の調製を行うこともできる。

(ii) cDNAの調製及び増幅

上記(i)で得たmRNAから、逆転写酵素を用いてL鎖及びH 鎖のV領域における c DNAをそれぞれ合成する。 c DNAの合成 は、Oligoーd Tプライマー又はL鎖C領域若しくはH鎖C領 域とハイブリダイズする適当なプライマー(例えばキット添付の c DNA合成プライマー)を用いることが出来る。

c D N A 合成反応は、前記m R N A とプライマーとを混合し、逆転写酵素の存在下で例えば 5 2 ℃で 3 0 分の反応を行う。

c D N A の増幅は、L 鎖及びH 鎖ともに 5 '-Ampli FINDER RACE kit (CLONTECH社)を用いた 5 '-RACE 法(Frohman, M. A. らProc. N atl. Acad. USA 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. らNucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989)に基づくPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)にて行うことが出来る。すなわち、上記で合成した 2 本鎖c D N A の両端にc D N A adapterを連結し、H鎖V領域及びL鎖V領域の断片をコードするD N A (以下、L鎖V領域の断片をコードするD N A (以下、L鎖V領域の断片をコードするD N A と略記することもある(H鎖V領域等についても同様))についてPCRを行う。

H鎖 V 領域の D N A を増幅するためのプライマーとして、例えば 5' 一側プライマーにはキット添付の Adapter primer $1 \ge 3'$ 一側プライマーにはマウス抗体の H鎖定常領域 M H C - G 1 プライマー(配列番号 1)(A T R - 2、A T R - 3、A T R - 4 および A T R - 5)(C γ 1 領域)あるいは M H C - G 2 a プライマー(配列番号 2)(A T R - 7 および A T R - 8)(C γ 2 a 領域)(S. T. J onesら,Biotechnology,9,88,1991)を用いることが出来る。また、L鎖 V 領域の D N A を増幅するためのプライマーとして、例えば 5' 一側プライマーにはキット添付の Adapter primer $1 \ge 3'$ 一側プライマーにはマウス抗体のL鎖 κ 鎖定常領域(C κ 領域)プラ

イマー(例えば配列番号3で表される塩基配列を有するMKCプライマー)を用いることが出来る。

(i i i) DNAの精製及び塩基配列の決定

PCR産物について、公知手法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的とするDNA断片を切り出した後、DNAの回収及び精製を行い、ベクターDNAに連結する。

DNAの精製は、フェノール及びクロロホルムで抽出するか(J.S ambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Labo ratory Press, 1989)、市販のキット(例えばGENECLEAN II; BIO1 01)を用いて行われる。DNA断片を保持するためのベクターDNAには公知のもの(例えば pUC19、Bluescript等)を用いることができる。

前記DNAと上記ベクターDNAとを、公知のライゲーションキット(宝酒造製)を用いて連結させ、組換えベクターを得る。次に、得られる組換えベクターを大腸菌JM109コンピテントセル(ニッポンジーン)等に導入した後アンピシリン耐性コロニーを選抜し、公知方法に基づいてベクターDNAを調製する(J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。目的とするDNAの塩基配列は、上記ベクターDNAを制限酵素で消化した後、公知方法(例えばジデオキシ法)により決定する(J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。本発明では、自動塩基配列決定装置(DNA Sequencer 373A, Perkin-Blmer)を用いることができる。

(iv)相補性決定領域(CDR)

H鎖V領域及びL鎖V領域は、抗原結合部位を形成し、その全般の構造は互いに類似性を有している。すなわち、それぞれ4つのフ

レームワーク領域(FR)部分が、3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。FRのアミノ酸配列は比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, B. A. ら、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。

前記4個のFRの多くの部分は、β-シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成する。CDRは、ある場合にはβ-シート構造の一部を形成することもある。従って、3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そしてFRは対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位を形成する。

このような事実に基づき、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベース(「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)にあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を見いだすことが出来る。

CDR領域の配列は、ヒト型化抗体を作製した際にヒトTFに対する結合活性及び中和活性が保持される範囲内であれば、挿入、置換又は欠失による改変体も本発明に含まれる。例えば、配列番号133-138の各CDR又は配列番号139-141,143-144,145-147及び149-150のV領域中の各CDR領域との相同性が90~100%の配列であるものが挙げられる。好ましくは、相同性が95~100%の配列であるものが挙げられる。さらに好ましくは、相同性が98~100%の配列であるものが挙げられる。さらに好ましくは、相同性が98~100%の配列であるものが挙げられる。

3. キメラ抗体の発現ベクターの作製

マウスモノクローナル抗体のマウスL鎖(以下、抗体のL鎖又は H鎖を表す場合は、マウスについては「マウスL鎖」、ヒト抗体の H鎖については「ヒトH鎖」のように略記することもある。)及び H鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これ らのマウスV領域をコードするDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させることによってキメラ抗ヒトTF 抗体が得られる。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化された c D N A に存在するマウスリーダー配列及び V 領域配列を、哺乳類 細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体 C 領域をコードする配列に連結することを含んでなる。あるいは、クローン化された c D N A に存在するマウスリーダー配列及び V 領域配列をヒト抗体 C 領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結することを含んでなる。

ヒト抗体 C 領域の断片は、任意のヒト抗体の H 鎖 C 領域及びヒト 抗体の L 鎖 C 領域のものとすることができ、例えばヒト H 鎖のもの については C γ 1 、 C γ 2 、 C γ 3 又は C γ 4 、及び L 鎖のものに ついては C λ 又は C κ を各々挙げることができる。

キメラ抗体の製造のためには、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む単一の発現ベクター(例えば、WO94/11523参照)を作製する。次に、この発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する(例えば、WO91/16928参

照)。単一の発現ベクターには、I g G 1 κ 型抗体発現ベクターN 5 K G 1 (V) 及び I g G 4 κ 型抗体発現ベクターN 5 K G 4 P ϵ 用いることができる。

(i) キメラ抗体 H 鎖の構築

キメラ抗体のH鎖発現ベクターは、マウスH鎖V領域をコードする c D N A を、ヒト抗体のH鎖 C 領域をコードする D N A を含む適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。H鎖 C 領域としては、例えば C γ 1、 C γ 2、 C γ 3 又は C γ 4 領域が挙げられる。

ここで、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを発現ベクターに挿入するにあたり、PCR法により該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'ー末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするため該cDNAの開始コドン直前にKozakコンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)を有するように設計したPCRプライマー、及び、該cDNAの3'ー末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を発現ベクターに導入することができる。

こうして構築したマウスH鎖V領域をコードする c D N A を適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、H鎖 C 領域(C γ 1 あるいは C γ 4)をコードする D N A を含むキメラH鎖発現ベクターを構築する。

(i i) キメラ抗体 L 鎖 κ 鎖をコードする c D N A を含む発現ベク ターの構築

キメラ抗体のL鎖発現ベクターは、マウスL鎖V領域をコードする c D N A を、ヒト抗体のL鎖C領域をコードするD N A を含む適

当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。L鎖 C 領域としては、例えば C κ 、 C λ 領域が挙げられる。

マウスL鎖V領域をコードする c D N A を含む発現ベクターを構築するにあたり、P C R 法により、該 c D N A に適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該 c D N A の 5 '一末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするための K o z a k コンセンサス配列を有するように設計した P C R プライマー、及び、3'一末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計した P C R プライマーを用いて P C R を行うことで、これら適当な塩基配列を該 c D N A に導入する。

こうして構築したマウスL鎖 V 領域をコードする c D N A を適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、L鎖 C 領域 (C κ 領域) をコードする D N A を含むキメラL鎖発現ベクターを構築する。

4. ヒト型化抗体の作製

(1) ヒト抗体との相同性検索

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されているヒト型化抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとしたいで、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖のV領域を、Data Bankを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較する。また、同時にKabatらにより、抗体のFRの長さ、アミノ酸の相同性等によって分類されたヒト抗体のサブグループ(HSG: Human subgroup)(Kabat, E. A. ら、USDep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)との比較を行う。

ヒトH鎖V領域の場合は、KabatらによるHSG分類により

、HSGI~IIIに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトT Fモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域は、HSGIのコンセンサス配列と67.8%のホモロジーを有する。一方、ヒトL鎖 κ 鎖V領域は、KabatらによるHSG分類により、HSGI~IVに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のL鎖 κ 鎖V領域は、HSGIのコンセンサス配列と72.3%のホモロジーを有する。

従来の技術によりマウス抗体をヒト型化する場合には、必要によっては、ヒト型化V領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているマウス抗体のV領域のFRの一部のアミノ酸配列をヒトV領域のFRに移植する場合がある。しかしながら、マウス抗体のV領域FRのどのアミノ酸をヒト抗体V領域のFRに移植すべきかについては、一定の法則がない。従って、CDRの構造を保持するために必須のアミノ酸を特定することは、多くの努力を必要とする。

また、FRの一部にマウス抗体のV領域からヒトV領域に移植されたアミノ酸配列に対するヒト抗体ができる危険性が存在する。本発明では、ヒト型化した抗体に於いてCDRを除く全てのアミノ酸配列をヒト抗体由来のアミノ酸配列とするために、CDRの立体構造を保持するために必要な四個のFR(FR1~4)について、一つのFRを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のFRと相同性の高いヒト抗体のFRを検索した。以下に、モノクローナル抗体ATR-5のH鎖及びL鎖のV領域の各FRについて、データーベースと相同性検索した結果を示す。

表 1

FRØ No	アクセッションNo	マウス抗体 H 鎖 V 領域の それぞれの FR とのホモロ ジー (%)	配列番号
H鎖FR1	L39130	53. 0	110
H鎖FR2	L39130	92. 9	111
	P01742	71.4	112
	280844	78.6	113
H鎖FR3	L39130 .	62.5	114
	234963	71.9	115
	P01825	53. 1	116
	M62723	68.8	117
•	Z80844	68.8	118
	L04345	65.6	119
	\$78322	75.0	120
	226827	56.3	121
	U95239	65.6	122
	L03147	65.6	123
H鎖FR4	L39130	90.9	124

表 2

FRØ No	アクセッションNo	マウス抗体L鎖V領域の それぞれのFRとのホモロ ジー (%)	配列番号
L鎖FRI	237332	78.3	125
L鎖FR2	237332	80.0	126
	\$65921	80.0	127
	X93625	80.0	128
L鎖FR3	237332	71.9	129
	\$68699	75.0	130
	P01607	71.9	131
L鎖FR4	237332	90.0	132

(2) ヒト型化抗体 V 領域をコードする D N A の設計

ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域の各FRを選択することである。また、FR shuffleにおいては、それぞれのFRにおいて、バラエティーの高いヒト抗体V領域FRを選択する必要がある。

本発明においては、モノクローナル抗体ATR-5に関しては、 日鎖については、マウス抗体日鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR2については3種類、FR3については1 0種類のヒト抗体V領域FRを選択した。L鎖については、マウス 抗体L鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR 2については3種類、FR3については3種類のヒト抗体V領域F Rを選択する事が出来る。

ヒト型化H鎖およびL鎖V領域ともに、第一のバージョン (バージョンa:ver.a)として、マウスモノクローナル抗体ATR

-5のH鎖およびL鎖V領域とそれぞれホモロジーの高いヒト抗体 H鎖およびL鎖V領域L39130とZ37332を選択する事が 出来る。これらのヒト型化抗体を作製するに当たり、FR shuffleを 容易に行えるように各CDR内部及びFRの適当な部位に、適当な 制限酵素認識部位を設計する事が出来る。こうすることにより、い ずれかのFRのみを容易に入れ替えることが可能になる。

例えばヒト型化H鎖CDR1の制限酵素EcoT22I認識部位、CDR2の制限酵素BalI認識部位、CDR3の制限酵素NcoI認識部位およびFR3の制限酵素XhoI認識部位、例えばヒト型化L鎖CDR1の制限酵素AflII認識部位、CDR2の制限酵素SpeI認識部位、CDR3の制限酵素PstI認識部位およびFR3の制限酵素AccIII認識部位である。

このように設計したバージョン a を基にして、それぞれのFRについてFR shuffleを行い、所望の活性を有するヒト型化抗体を作製する事が出来る。

(3) ヒト型化抗体 V 領域の断片の作製

本発明のヒト型化抗体は、該抗体のC領域、及びV領域のFRがヒト抗体由来のものであり、V領域のCDRがマウス抗体由来のものである。本発明のヒト型化抗体のV領域の断片は、鋳型となるヒト抗体のDNA断片が入手可能ならば、PCR法によるCDRーグラフティングと呼ばれる手法により作製することができる。「CDRーグラフティング」とは、マウス由来のCDRをコードするDNA断片を作製し、これを鋳型となるヒト抗体のCDRと入れ換える手法をいう。

また、鋳型となるヒト抗体のDNA断片が入手できない場合は、 データベースに登録されている塩基配列をDNA合成機で合成し、 PCR法によりヒト型化抗体V領域を作製することができる。さら

に、アミノ酸配列のみデータベースに登録されている場合は、そのアミノ酸配列を基に、 Kabat, E.A. らの報告(US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) している抗体のコドン使用頻度に基づいて、全塩基配列を類推することができる。この塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域の断片を作製することができる。

(i) ヒト型化H鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの 構築

本発明では、ヒト型化抗体の鋳型とするヒト抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化H鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域と高い相同性(ホモロジー)を有するL39130をヒト型化H鎖V領域バージョン"a"として作製することが出来る。ヒト型化H鎖V領域バージョン"a"を作製するためには、例えば配列番号22~26に示す5本のプライマー及び配列番号27、28に示す2本の外部プライマーに分けて使用する。

CDRーグラフティングプライマー h R 5 H v 1 S (配列番号 2 2)、h R 5 H v 2 S (配列番号 2 3)及びh R 5 H v 4 S (配列番号 2 4)はセンスD N A 配列を有し、そしてCD R グラフティングプライマー h R 5 H v 3 A (配列番号 2 5)及びh R 5 H v 5 A (配列番号 2 6)はアンチセンスD N A 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 1 8 - 3 5 b p の相補的配列を有する。h R 5 H v 1 S は K o z a k コンセンサス配列 (Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)および S a 1 I 認識部位を有するように、また h R 5 H v 5 A は N h e I 認識部位を有するように設計す

る。また外部プライマー h R 5 H v P r S (配列番号 2 7) 及び h R 5 H v P r A (配列番号 2 8) は C D R グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S 及び h R 5 H v 5 A とホモロジーを有する。

PCR法を用いて、5本のプライマーをアセンブリさせ完全長のcDNA合成し、さらに外部プライマーを加えDNAの増幅を行う。PCR法によるアセンブリとは、hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv4S、hR5Hv3A及びhR5Hv5Aとがその相補的配列によりアニーリングし、完全長のヒト型化H鎖V領域のDNAが合成されることを指す。

ヒト抗体H鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えばヒトH鎖Cγ1、Cγ2、Cγ3又はCγ4を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体 H 鎖 V 領域の D N A は、任意のヒト抗体 H 鎖 C 領域、例えばヒト H 鎖 C 領域 C γ 1 または C γ 4 の D N A と連結することができる。 キメラ抗体 H 鎖 の 構築で述べたように、 適当な制限酵素にて処理した後、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト H 鎖 C 領域をコードする D N A と連結し、ヒト型化 H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域の D N A を含む発現ベクターを作製する。

(ii)ヒト型化L鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクター の構築

本発明では、H鎖V領域をコードするDNAの場合と同様、鋳型となるヒト抗体のL鎖V領域の遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化L鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のL鎖V領域と高い相同性(ホモロジー)を有するZ37332をヒト型化L鎖V領域バ

ージョン "a" として作製することが出来る。

ヒト型化L鎖V領域バージョン "a"を作製するためには、CDRーグラフティングプライマート5Lv1S(配列番号85)及びh5Lv4S(配列番号86)はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマート5Lv2A(配列番号87)、h5Lv3A(配列番号88)及びh5Lv5A(配列番号89)はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。プライマーh5Lv1Sは、Kozak, M,ら、J. Mol. Biol. 196,947-950,1987)および制限酵素Bg1II認識部位を有するように、またh5Lv5Aは制限酵素Sp1I認識部位を有するように設計する。また、外部プライマーh5LvS(配列番号91)はCDRグラフティングプライマーh5Lv1S及びh5Lv5Aとホモロジーを有する。

ヒト型化H鎖V領域と同様に、PCR法を用いて、5本のプライマーをアセンブリさせ完全長のcDNA合成し、さらに外部プライマーを加えDNAの増幅を行うことが出来る。

ヒト抗体L鎖 C 領域は任意のヒトL鎖 C 領域であることができ、 例えばヒトL鎖 C λ や C κ を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体L鎖V領域のDNAは、 任意のヒト抗体L鎖C領域、例えばヒトL鎖CκやCλ領域のもの と連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハン サー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトL鎖κ鎖 C領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化L鎖V領域及びヒト L鎖κ鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する

前記のようにして、ヒト型化抗体のV領域断片が作製されても、

該V領域断片が抗体としての活性(抗原に対する結合活性、中和活性等)を有するか否かは必ずしも明らかではない。そのため、ヒト型化H鎖との組み合わせによりCOS-7のごとき動物細胞で発現させ、活性の有無を検討する必要がある。

(i i i) ヒト型化抗体のH鎖及びL鎖V領域のFR shuffle

本発明者は、作製したヒト型化H鎖及びL鎖V領域を含むヒト型 化抗体をCOS-7のごとき動物細胞で一過性に発現させ、抗原結 合活性及び中和活性について検討した結果、抗原結合活性及び中和 活性を有するものの、キメラ抗体と比較して十分でないことがこと が判明した。

本発明者は、ヒト型化H鎖及びL鎖V領域の各FRを順次 shuff leすることにより、この問題を解決する事が出来る。FRの shuff leに用いるヒト抗体は、既存のデータベースより選択する事が出来る。選択したヒト抗体のFRは、データベースで明らかになっている塩基配列を基に、DNA合成機により合成することが出来る。この際、前記のように、CDRもしくはFRに設計した制限酵素認識配列を付加することにより、上記で作製したヒト型化抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRと、容易に shuffleすることが出来る。このようにして作製したヒト型化抗体の活性を調べることにより、所望する抗原結合活性並びに中和活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

例えば、ヒト型化抗体V領域H鎖FR3をヒト抗体234963(GenBank, Borretzen M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 12917-12 921, 1994)由来のFR3に shuffleする事が出来る。

FR-シャッフリングプライマーF3RFFS(配列番号35) およびF3RFBS(配列番号36)はセンスDNA配列を有し、 F3RFFA(配列番号37)およびF3RFBA(配列番号38

)はアンチセンスDNA配列を有する。FR-シャッフリングプライマーF3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBAはDNA合成機で合成することが出来る。

F3RFFSとF3RFFA、F3RFBSとF3RFBAをアニールさせ、それぞれBallおよびXhol、NcolおよびXholで消化した。これらをBallおよびNcolで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(Ball/Ncol)に導入し、塩基配列を確認することにより正しい配列を有するプラスミドを得ることが出来る。このようにして得られたヒト型化抗体H鎖を含むプラスミドをhATR5Hvb/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖をバージョン"b"とする。その塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号39に示し、バージョン"b"のアミノ酸配列を配列番号39に示す。

同様にして、データベースから選択した他のヒト抗体V領域H鎖およびL鎖由来のFRについても、ヒト型化抗体V領域H鎖及びL鎖のFRと shuffleすることが出来る。

ヒト型化抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域のFRを shuffleするためのさらに好ましいヒト抗体を選択するためには、以下のようにして行うことが出来る。すなわち、ヒト型化抗体H鎖バージョン"b"とキメラ抗体L鎖の組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の中和活性を有する。しかしながら、ヒト型化抗体H鎖バージョン"b"とヒト型化抗体L鎖バージョン"a"との組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体より中和活性が低下している。

このような場合に、FRをshuffleするため候補とするヒト抗体を選択するためには、例えば、ヒト型化抗体H鎖バージョン

"b"のFR3(アクセッションNo. 234963:配列番号115)に対する相同性検索を行い、この配列と相同性の高いヒト抗体を選択することが出来る。例えば、このようにして選択したヒト抗体H鎖V領域FR3では、U95239(配列番号122)やL03147(配列番号123)が挙げられる。

このようにして作製したヒト型化抗体 V 領域 H 鎖のアミノ酸配列を表 3 及び表 4 に示し、そしてヒト型化抗体 V 領域 L 鎖のアミノ酸配列を表 5 に示す。

	7 ミノ酸配列	CDR2	5 6	012A3456789012345	GNDPANGHSMYDPKFQG						; ; ! ! ! ! ! ! ! ! !								
		FR2	4	67890123456789	WVKQRPGQGLEWIG										R-AM-	R-AM-	R-A	R-A	
ബ		CDR1		12345	DYYMH	1	 	1 1 1 1	 	1 1 1 1	 	; ; ;	 	1 1 1 1	 	1 1 1 1	 	 	
表3	H鎖V領域のアミノ酸配列	FRI	1 2 3	123456789012345678901234567890	QVQLLBSGAVLARPGTSVK I SCKASGFN I K														
					L39130(a)	Z34963(b)	M30885(c)	M62723(d)	Z80844(e)	L04345(f)	S78322(g)	226827(h)	195239(i)	L03147(j)	P01742(b1)	P01742(d1)	280844(b3)	280844(43)	

4	I
炭	١
ntá	ł

	FR4	11	34567890123	WGQGTLVTVSS			; ; ; ;		; ; ; ; ; ;						1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
(続き)	CDR3	10	56789012	DSGYAMDY	† 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1] ; ; ; ;	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	 	 	 	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1	1 1 1 1 1	
H鎖V領域のアミノ酸配列(続き)		6	67890123456789012ABC345678901234	RAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCAR	-RST-I	'-AA-T	RSF	RSTF	RSD-T	RSS	KAS-T-I-F	RST	RSA-T	RST-I	RSF	RST-I	RSF
	FR3	8	3456789012ABC	TSASIAYLEFSSL	-VTIDTNTM-LRST-I	-VTMLVDKNQFS-RLV-AA-T	-VTIDE-T-TM-LRSF	-VSIDE-TKM-LNRSTF	-VTIDT-T-T-M-LRRSD-T	K-TDE-S-TMQLRSS	-VTMS-DK-S-AQWTKAS-T-I-F	-VTIDT-TVFM-LRST	-VTFDNTM-LRRSA-T	-VTIDTNTM-LRST-I	-VTIDB-T-T-M-LRSF	-VTIDTNTM-LRST-I-	-VTIDE-T-TM-LRSF
		7	6789012	RAKLTAA	-VTID	-VTMLVD	-VTID]	-VSID	-VTID	K-TD	-VTMS-DI	-VTID	-VTFD	-VTID	-VTIDI	-VTID	-VTIDI
				L39130(a)	234963(b)	M30885(c)	M62723(d)	Z80844(e)	L04345(f)	S78322(g)	226827(h)	U95239(i)	L03147(j).	P01742(b1)	P01742(d1)	280844(b3)	280844(d3)

表5 L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1		FR2		
	1	2	3	4		5	
	1234567890	123456789012	3 45678901	234 567890	123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQMTQSPSSI	LSASVGDRVTIT	C KASQDIKS	FLS WYQQKP	GKAPKLLIY	YATSLAD	
S68699(b)							
P01607(c)			- 				
S65921(b1)				F	ST		
X93625(b2)					ES		
		FR3		CDR3	FR4		
	6	7	8	9	10		
	78901234567	789012345678	9012345678	901234567	890123456	37	
Z37332(a)	GVPSRFSGSGS	GTDFTLT ISSL	QPEDFATYYC	LQHGESPYT	FGGGTKVE	K	
\$68699(b)		ү					
P01607(c)		γ	I				
S65921(b1)		ү					
X93625(b2)		ү					

前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖及びL鎖V領域各バージョンは、任意のヒト抗体H鎖C領域およびL鎖C領域、例えばそれぞれヒトH鎖Cγ4およびヒトL鎖Cκ領域のDNAと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトH鎖Cγ4およびヒトL鎖Cκ領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化H鎖及びL鎖V領域各バージョンをコードするDNAと、それぞれヒトH鎖Cγ4及びヒトL鎖Cκ領域をコードするDNAとを含む発現ベク

ターを作製する。

また、前記のようにして構築したヒト型化抗体 H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする D N A と、ヒト型化 L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする D N A とを、単一の発現ベクター(例えば、W O 9 4 / 1 1 5 2 3 参照)に導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするヒト型化抗体を生産させることができる。

5. キメラ抗体及びヒト型化抗体の製造

キメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するためには、H鎖V領域及びH鎖C領域をコードするDNA、並びにL鎖V領域及びL鎖C領域をコードするDNAを単一ベクターに連結し、適当な宿主細胞を形質転換し、抗体を産生させることができる。すなわち、キメラ抗体の発現には、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制領域による制御のもとで、クローニングされたcDNAに存在するマウスリーダー配列並びにマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAと、マウスリーダー配列並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター(例えば、WO94/11523参照)に導入する。

ヒト型化抗体の発現には、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化日鎖V領域及びヒト日鎖C領域をコードするDNAと、ヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター(例えば、WO94/11523参照)に導入する。そして、これらのベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体を生産させる。

また、H鎖V領域およびL鎖V領域を含むそれぞれ2種類の発現ベクターを作製することが出来る。すなわち、キメラ抗体については、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスL鎖V領域及びヒト型化抗体については、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。

あるいはまた、キメラ抗体については、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、マウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。

次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造する(例えば、WO91/16928参照)。

以上のようにして目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ

抗体又はヒト型化抗体は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで 精製することができる。

本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体又はヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体又はヒト型化抗体は分離・精製することができる。

ヒトTFに対する本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するために、任意の発現系を使用することができる。例えば、真核細胞を用いる場合は動物細胞(例えば樹立された哺乳類細胞系)、真糸状菌細胞又は酵母細胞などが挙げられ、原核細胞を用いる場合は細菌細胞(例えば大腸菌細胞等)などを使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター 1 α (H E F - 1 α) などの

哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法(Nature, 277, 108, 1979)、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法(Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990)に従えば容易に実施することができる。

複製起原としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH(3′)川又はI(neo)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチンーグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Bcogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子等を含むことができる。

- 6. キメラ抗体及びヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性の評価
- (1) ELISAによる抗体の濃度測定

得られた精製抗体の濃度の測定は、ELISAにより行うことができる。

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製する。ELISA用96穴プレート(例えばMaxisorp, NUNC)の各穴を例えば $1~\mu$ g / m 1 の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgGγ抗体(BioSource)100 μ 1 を固相化する。

200μ1の希釈バッファー(以下、DBと称する。例えば50mM Tris-HCl、1mM MgCl2、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaNa、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、キメラ抗体、若しくはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞若

しくはCHO細胞の培養上清、又は精製キメラ抗体、若しくはEF型化抗体を段階希釈して各穴に加える。次にアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗EFF1 g G抗体 EFF1 EFF2 EFF3 EFF4 EFF4 EFF5 EFF6 EFF6 EFF7 EFF7 EFF8 EFF9 E

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCellELISAプレートでは、次のようにして調製する。ヒト膀胱癌細胞J82(ATCCHTB-1)を、細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10 6 個の細胞数で播き込む。これを CO_2 インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させる。培養液を捨て、 $300\mu1$ のPBSで各穴を2回洗浄する。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に $100\mu1$ 加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化する。

PFA/PBSを捨て、300μlのPBSで各穴を2回洗浄後、250μlのDBでブロッキングする。キメラ抗体またはヒト型化抗体を含む培養上清、あるいは精製したキメラ抗体またはヒト型化抗体をDBにて段階希釈して100μlを各穴に加え、室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗体(BioSource)100μlを加える。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で測定する。

(3) 中和活性の測定

これに 3.245μ g / m 1 のヒトファクター X (セルサス・ラボラトリーズ) および 82.5 n g / m 1 のヒトファクター V I I a (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ 10μ 1 加え、さらに室温で 1 時間 反応させる。 0.5 Mの E D T A e 10μ 1 加え、反応を停止させ、発色基質溶液を 50μ 1 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で 405/655 n m の吸光度を測定する。室温で 1 時間 反応させ、再度 405/655 n m の吸光度を測定する。抗体無添加の 1 時間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出することにより、中和活性を測定する

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix)を添付文書に従い溶解し、精製水で 2 倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製する。

7. ヒト型化抗体と可溶性TFとの相互作用による反応速度論的解析

BIACOREによって本発明の抗TF抗体のkinetics paramet er、すなわち解離定数(KD)、解離速度定数(kdiss)及び結合速度定数(kass)を測定することができる。

組換型ProteinGをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合

させ、抗原として精製した組換型TF(1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶型TF)(以下、可溶型TFと称す)を用い、種々の濃度に調製した可溶型TFをアナライトとする。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター(解離速度定数kdiss及び結合速度定数kass)を算出することによって解離定数を求めることができる。速度論的解析に関しては、「Kineticanalysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(karlsson、R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.)などを参考にすることができる。

本発明の抗TF抗体は、解離定数(KD)が小さい値であるほど中和活性を有する点で好ましい。本発明の抗TF抗体において、KD値は2. 30×10^{-8} [1/M] 以下であることが好ましく、2. 30×10^{-9} [1/M] 以下であることがより好ましく、1. 17×10^{-9} [1/M] 以下のものが最も好ましい。

また、KD値は解離速度定数(kdiss)及び結合速度定数(kass)の2つのパラメーターから決定される(KD=kdiss/kass)。したがって、kdissの値が小さく、kassの値が大きければ、KD値が小さくなることは明らかである。

具体的には、本発明の抗TF抗体の場合、kdissの値が9. 52×10^{-3} [1/sec]以下であればよい。好ましくは、kdissの値が9. 52×10^{-4} [1/sec]以下であり、最も好ましくは6. 35×10^{-4} [1/sec]以下である。

一方、kassの値は4.15×10'[1/M・sec]以上であればよい。好ましくは、kassの値が4.15×10'[1/M・sec]以上であり、最も好ましくは4.65×10'[1/M・sec]以上である。

さらに、k d i s s の値が 9. 5 2 \times 1 0 $^{-3}$ [1 / s e c] 以下であり、かつ、k a s s の値が 4. 1 5 \times 1 0 4 [1 / M・s e c] 以上の抗TF抗体も好ましい。

さらに具体的には、本発明の抗TF抗体は、KD値が1.09× $10^{-10}\sim2$. 30×10^{-8} [1/M] の範囲であり、1.09× $10^{-9}\sim2$. 30×10^{-9} [1/M] のものが好ましく、1.09× $10^{-9}\sim1$. 39×10^{-9} [1/M] のものが最も好ましい。

また、k d i s s 値が 5. $0.6 \times 1.0^{-4} \sim 9$. 5.2×1.0^{-3} [1 / s e c] の範囲であり、 5. $0.6 \times 1.0^{-4} \sim 9$. 5.2×1.0^{-4} [1 / s e c] のものが好ましく、 5. $0.6 \times 1.0^{-4} \sim 6$. 4.9×1.0^{-4} [1 / s e c] のものが最も好ましい。

これらのKD値、kdiss値及びkass値は、BIACOR E以外にもスキャッチャード解析、あるいはBIACOREなどの 表面プラズモン共鳴センサー等により得ることができるが、BIA COREを用いて得ることが好ましい。

8. ヒト型化抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットブロットハイブリダイゼーション法によって、本発明のヒト型化抗体の非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TFへの 反応性を検討することができる。

TFはヒト組織より精製したもの、もしくはCHO細胞の哺乳動物細胞で発現させ精製したもの等を用い、検討できる。また、変性剤には尿素の代わりにグアニジン塩酸塩やSDS等を用いることができ、還元剤にはDTTの代わりに2-メルカプトエタノールなど

のSH還元試薬を用いることもできる。ヒト型化抗体の検出には様々な物質で標識された抗ヒトIgG抗体を用いることができる。ここでいう標識物質は例えば、放射性物質、ビオチン、FITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素などである。本発明の抗TF抗体は、非変性TF、非還元下変性TFならびに還元下変性TFのいずれにも反応する。

9. ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び D I C 治療 剤

ヒトTFに対するヒト型化抗体の治療効果を確認するには、ヒト型化抗ヒトTF抗体を高DIC症状を呈した動物に投与し、DICの指標を測定することによりその治療効果を確認することができる。

本発明で使用される抗体は、ヒトTFに対するヒト型化された抗体である。この抗体は、ヒトTFに結合することにより、ヒトTFの活性を中和する抗体であり、特に、好ましくはヒト型化されたATR5抗体が挙げられる。ヒト型化ATR5抗体の作製方法は、実施例に記載されている。

本発明で使用される抗体は、塩析法、HPLC等を用いたゲル濾過法、プロテインAカラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィー法等の通常の精製手段を組み合わせて高純度に精製することができる。このように精製された抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、あるいは蛍光抗体法(Immunofluorescence Analysis)等の通常の免疫学的手段により、高精度にヒトTFを認識することを確認できる。

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤は、非経口的に全身又は局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内

注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適 宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体 重1kgあたり 0.0 1 mgから1000mgの範囲で選ばれる。あ るいは、患者あたり10mg/body、好ましくは1~1000 mg/bodyの投与量を選ぶことができる。

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組 成物及びDIC治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体 や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加 物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポ リビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポ リマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸 ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボ キシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エ チルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラ チン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、 ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアル コール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA) 、マンニトー ル、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面 活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応 じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択されるが、これらに限 定されるものではない。

発明の効果

本発明により、ヒトTFに対するキメラ抗体およびヒト型化抗体ならびにヒト型化抗体の作製方法が提供される。これらの抗体は、ヒトにおける抗原性が低いことから、治療薬として有用である。

実施例

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

<u>実施例1.</u> <u>ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域</u> をコードするDNAのクローニング

(1) mRNAの調製

ハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5(IgG1 κ)、ATR-7、及びATR-8(IgG2 $a\kappa$)からmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech)を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)-セルロ-ススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。

(2)マウス抗体 V 領域をコードする遺伝子の c D N A の作製及び 増幅

(i)H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5′-RACE 法(Frohman, M. A. et a l., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5′-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit(CLON TECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。

前記のようにして調製したmRNA約 1μ gを鋳型として、キット添付の cDNA synthesis primerを加え、逆転写酵素と42%、60分間反応させることにより cDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼ I、DNAリガーゼ、RNase Hで16%、1.5時間、T4DNAポリメラーゼで16%、45分間反応させることにより、2本鎖 cDNAを合成した。2本鎖 cDNAをつ

ェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

T4 DNAリガーゼで16 $\mathbb C$ で一夜反応することにより、2 本鎖 c DNAの両端にc DNA アダプターを連結した。反応混合液は10 mM Tricine-KOH(p H8.5)、0.1 mM EDTA溶液で50 倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5' ー側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1 を、3' ー側プライマーにはMHC-G1プライマー(配列番号1)(ATR-2、ATR-3、ATR-4及びATR-5)あるいはMHC-G2aプライマー(配列番号2)(ATR-7及びATR-8)(S.T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

ATR-2、3、4及び5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100μ1中に120mM Tris-HC1(pH8.0)、10mM KC1、6mM (NH,)2SO,、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgC12、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、30~50pmoleのアダプタープライマー1並びにMHC-G1プライマー、及びcDNAアダプターを連結したcDNAの反応混合物1~5μ1を含有する。

PCRはいずれもDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、9.4 ℃にて3.0 秒間、5.5 ℃にて3.0 秒間、7.4 ℃にて1.5 分間の温度サイクルで3.0 回行った。

(ii) L鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5′-RACE 法 (Frohman, M. A. et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky , A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。 5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit(CL ONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製したmRNA約 $I\mu$ gを鋳型としてcDNA合成プライマーを加え、逆転写酵素と 42%、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

これをDNAポリメラーゼ I、DNAリガーゼ、RNaseHで 16%、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16%、45分間反応させることにより、2本鎖 c DNAを合成した。2本鎖 c DNAをつまり、2本鎖 c DNAを合成した。2本鎖 c DNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNAリガーゼで16%でで一夜反応することにより、2本鎖 c DNAの両端に c DNA アダプターを連結した。反応混合液は10 mM Tricine-KOH (pH8.5)、0.1 mM E D T A 溶液で50 倍に希釈した。これを鋳型として P C R によりし鎖 V 領域をコードする遺伝子を増幅させた。5 $^{\prime}$ 一側プライマーには M K C プライマー (配列番号 3) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

P C R 溶液は、100μ1中に120mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH.)2SO.、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl2、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、30~50pmoleのアダプタープライマー1並びにMKCプライマー、及びcDNA アダプターを連結したcDNAの反応混合物1μ1を含有する。

P C R は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94 $^{\circ}$ $^{\circ}$ Cにて 30 秒間、55 $^{\circ}$ Cにて 30 秒間、74 $^{\circ}$ にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

(3) PCR生成物の精製及び断片化

前記のPCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素 X ma I (New England Biolabs) により37℃で1時間消化した。 X ma I 消化混合物を2%から3%のNuSieve GTG アガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H鎖V領域として約500bp長、L鎖V領域として約500bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HC1(pH8.0)、1mM EDTA溶液(以下、TEと称す)10μ1に溶解した。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域及びL鎖V領域をコードする遺伝子を含むXmaI消化DNA断片と、XmaIで消化することにより調製したpUC19プラスミドベクターとをDNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $\mathbb C$ にて 1 分間静置した。

次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Pr

ess, 1989)(以下、LBA寒天培地と称す)上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を 5 0 µg/ml アンピシリンを含有する L B 培地(以下、 L B A 培地と称す) 3 m l あるいは 4 m l で 3 7 ℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド D N A を調製し、塩基配列の決定を行った。

(4) マウス抗体 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Term inator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造) (配列番号 4) 及びM13 Primer RV(宝酒造) (配列番号 5) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7及びATR-8に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれATR-xHv/pUC19(x=2、3、4、5、7又は8)とそれぞれATR-xLv/pUC19(x=2、3、4、5、7又は8)と命名した。プラスミドATR-xHv/pUC19(xロードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む)をそれぞれ配列番号12から17に示す。

実施例2. キメラ抗体の構築

マウスATR-5 抗体V領域をヒト抗体C領域に連結したキメラ ATR-5 抗体を作製した。ATR-5 抗体V領域をコードする遺 伝子をヒト抗体C領域をコードする発現ベクターに連結することに より、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

(1) キメラ抗体 H鎖 V領域の構築

ヒト抗体H鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体H鎖V領域をPCR法により修飾した。5′ー側プライマーch5HS(配列番号18)はV領域をコードするDNAの5′ー末端にハイブリダイズし、且つKozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素Sallの認識配列を有するように設計した。3′ー側プライマーch5HA(配列番号19)はJ領域をコードするDNAの3′ー末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素Nhelの認識配列を有するように設計した。

P C R 溶液は、 100μ 1中に120mM T r is -HC l (pH8.0)、10mM K C l、6mM (NH_4)。2000、0.1% B S A、0.1% T r i t on X -100、0.001% B S A、0.2mM d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、1mM M g C 12、2.52 - y トの K O D D N A ポリメラーゼ(東洋紡績)、50p m o 1e の c n 5 H S プライマー並びに c n 5 H A プライマー、及び鋳型 D N A として 1μ 1のプラスミドA T R 5 H v / p U C 19を含有する。 P C R は D NA Thermal Cy cler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94 ℃にて 30 秒間、55 ℃に 30 秒間、74 ℃にて 10 分間の温度サイクルで 30 回行った。

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅 したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制 限酵素NheI(宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制

クローニングベクターには制限酵素 N h e I、Sall及びSplI、BglIIの認識配列を導入した改変pUC19ベクター(以下、CVIDECと称す)を用いた。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子断片とN h e I 及びSalIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 m 1 で 3 7 $^{\circ}$ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Pla smid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド D N A を調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。この A T R - 5 抗体 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し

、5′-側にSalI認識配列及びKozakコンセンサス配列、 3′-側にNheI認識配列を持つプラスミドをchATR5Hv /CVIDECと命名した。

(2) キメラ抗体 L鎖 V領域の構築

ヒト抗体L鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体L鎖V領域をPCR法により修飾した。5′ー側プライマーch5LS(配列番号20)はV領域をコードするDNAの5′ー末端にハイブリダイズし、且つKozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素BglIIの認識配列を有するように設計した。3′ー側プライマーch5LA(配列番号21)はJ領域をコードするDNAの3′ー末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素SplIの認識配列を有するように設計した。

PCR溶液は、 100μ 1中に120mM Tris-HC1(pH8.0)、10mM KC1、6mM (NH,)。SO,、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgC1。、2.52m2、2.52m4のKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、50pmo1eoch5LSプライマー並びに <math>ch5LAプライマー、及び鋳型DNAとして $1\mu1$ のプラスミドATR5Lv/pUC19を含有する。PCRはDNAThermalCycler480(Perkin-Elmer)を用い、<math>94Cにて 30秒間、55Cにて 30秒間、74Cにて 100分間の温度サイクルで 300回行った。

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅 したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制 限酵素Spll(宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制 限酵素Bgll(宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消

化混合物を 3 % NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 4 0 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、 2 0 μ 1 の T E に溶解した。

上記のようにして調製したマウスL鎖V領域をコードする遺伝子 断片とSp1I及びBg1Ⅱで消化することにより調製したCVI DECベクターをDNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ 1に加え、氷上で30分間、42 $^{\circ}$ にて1分間静置した。次いで300 μ 1の $^{\circ}$ Hi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした後、100 μ g/m1 LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37 $^{\circ}$ Cにて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3m1で37 $^{\circ}$ Cにて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4(宝酒造)及び M13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。この A T R ー 5 抗体 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し、5′ー側に B g l l l 認識配列及び K o z a k コンセンサス配列、3′ー側に S p l l 認識配列を持つプラスミドを c h A T R 5 L v / C V l D E C と命名した。

(3) キメラ抗体発現ベクターの構築

IDEC社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。ベクターにはIgG1型抗体発現ベクターN5KG4Pを用いた。発現ベクターN5KG4Pを用いた。発現ベクターN5KG4Pのヒト抗体H鎖C領域の直前にあるSalI-NheI部位にATR-5のH鎖V領域をコードする遺伝子を、ヒト抗体L鎖C領域の直前にあるBglII-SplI部位にATR-5のL鎖V領域をコードする遺伝子を、キメラATR-5抗体発現ベクターを作製した。

(i) H鎖V領域の導入

プラスミド c h A T R 5 H v / C V I D E C を制限酵素 N h e I (宝酒造)により 3.7 $\mathbb C$ で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a 1 I (宝酒造)により 3.7 $\mathbb C$ で 3 時間消化した。この消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTG ア ガロース (FMC BioProducts)を用いたア ガロースゲル電気泳動により分離し、約 4.5.0 b p 長の D N A 断片を含有するア ガロース片を切り出した。ア ガロース片をフェノール及 びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 2.0 μ I に溶解した。

発現ベクターN 5 K G 1 (V) 及びN 5 K G 4 Pを制限酵素Nhe I (宝酒造)により 3 7 \mathbb{C} で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I (宝酒造)により 3 7 \mathbb{C} で 3 時間消化した。この消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9 0 0 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 6 0 μ 1 に溶解した。

上記のようにして調製したH鎖V領域をコードする遺伝子を含む

SalI-NheI DNA断片とSalI及びNheIで消化したN5KG1(V)あるいはN5KG4PをDNAライゲーションキットver. 2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi - Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A 培地 3 m 1 で 3 7 $^{\circ}$ にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドD N A を調製した。これらキメラA T R $^{\circ}$ 5 抗体 H 鎖をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ $^{\circ}$ c h A T R $^{\circ}$ H v $^{\prime}$ N $^{\circ}$ K G 1 (V)、及び $^{\circ}$ c h A T R $^{\circ}$ H v $^{\prime}$ N $^{\circ}$ K G 4 P と命名した。

(ii) L鎖V領域の導入

プラスミド chATR 5 L v / C V I D E C を制限酵素 B g 1 II (宝酒造)及び S p 1 I (宝酒造)により 3 7 ℃で 1.5 時間消化 した。この消化混合物を 1.5% N u S i e v e G T G ア ガロ ース (FMC Bio Products)を用いたア ガロースゲル電気泳動により分離し、約400 b p 長の D N A 断片を含有するア ガロース片を切り 出した。ア ガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、 D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、 20μ1の T E に溶解した

プラスミド c h A T R 5 H v / N 5 K G 1 (V) 及び c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P を制限酵素 B g l II (宝酒造) 及び S p 1 I (宝酒造) により 3 7 ℃で 1. 5 時間消化した。この消化混合物を

1. 5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約9400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、 $TE20\mu1$ に溶解した。

上記のようにして調製したL鎖V領域をコードする遺伝子を含む SplI-BglII DNA断片とSplI及びBglIIで消化し たchATR5Hv/N5KG1(V)あるいはchATR5Hv /N5KG4PをDNAライゲーションキットver. 2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi - Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて $^{\circ}$ にて $^{\circ}$ 一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を 5 0 μ g $^{\prime}$ m 1 アンピシリンを含有する 2 \times Y T 培地 1 1 で 3 7 $^{\circ}$ にて $^{\circ}$ で 信 養し、菌体画分から P 1 a s m i d Maxi Kit (Q I A G E N)を用いてプラスミド D N A を調製した。これらキメラ A T R $^{\circ}$ 5 抗体をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ c h A T R 5 $^{\prime}$ N 5 K G 1 (V)、 c h A T R 5 $^{\prime}$ N 5 K G 4 P と 命名した。

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミドchATR5/N5KG1(V)あるいはchATR

5/N5KG4PをGene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。ダルベッコPBS(-)(以下、PBSと称す)中に1x10 7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド 50μ gを加え、 $1,500V,25\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO) を含有するDME M培地(GIBCO) に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO(アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepha rose Fast Flow(Pharmacia Biotech) を用いて以下のように精製した。

1 m l のrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充塡し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。

次に、13.5 mlの2.5 mM HCl(pH3.0)を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに1.5 mlの1M Tris-HCl(pH8.0)を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ 1 0 0 (A m i c o n) を用いた限外濾過を 2 回行うことにより、 1 5 0 m M N

a C l を含む 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7. 6) (以下、T B S と称す)に溶媒を置換し、最終的に約1. 5 m l まで濃縮した。

(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、CHO-S-SFMII無血清培地(GIBCO) に馴化したCHO細胞(DG44) に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミド c h A T R 5 / N 5 K G 1 (V) あるいは c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を制限酵素 S s p I (宝酒造) で切断して直鎖状 D N A にし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール 沈殿で D N A を回収した。直鎖状にしたプラスミドを G e n e P u l s e r 装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションにより D G 4 4 細胞に形質導入した。 P B S 中に 1×10^7 細胞/ m 1 の細胞濃度で懸濁されている D G 4 4 細胞 0. 7×10^7 細胞/ m 1×10^7 の か 電容量に 1×10^7 の か で ラスミド 1×10^7 の 1×10^7 の

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞をヒポキサンチン・チミジン(GIBCO)を含有するCHO-S-SFMII培地(GIBCO)に懸濁し、2枚の96穴プレート(Falcon)を用いてCO2インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン(GIBCO)及び500μg/m1 GENETICIN (G418Sulfate、GIBCO)を含有するCHO-S-SFMII培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

実施例3. ヒト型化抗体の構築

- (1) ヒト型化抗体 H鎖の構築
- (i) ヒト型化H鎖バージョン"a"の構築

ヒト型化ATR-5 抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体L39130 (DDBJ, Gao L.ら、未発表、1995) 由来のFRを有するヒト型化ATR-5 抗体H鎖バージョン "a"の作製のために7個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S (配列番号22)、hR5Hv2S (配列番号23)及びhR5Hv4S (配列番号24)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーhR5Hv3A (配列番号25)及びhR5Hv5A (配列番号26)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18-35bpの相補的配列を有する。

hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列(Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)及びSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計した。また外部プライマーhR5HvPrA(配列番号28)はCDRグラフティングプライマーhR5Hv1Sと、hR5HvPrA(配列番号28)はCDRグラフティングプライマーhR5Hv1Sと、hR5HvPrA(配列番号28)はCDRグラフティングプライマーhR5Hv5Aとホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S、 h R 5 H v 2 S、 h R 5 H v 3 A、 h R 5 H v 4 S及び h R 5 H v 5 A、ならびに外部プライマー h R 5 H v P r S及び h R 5 H v P r A は P h a r m a c i a B i o t e c h により合成及び精製された。

PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、9 8 μ 1 中に 1 2 0 mM Tris-HC1 (pH 8. 0)、10 m M KC1、6 mM (NH,) 2 SO, 0. 1% Trito

n X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgC1 $_2$ 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、CDRーグラフティングプライマー hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5Aをそれぞれ5pmo1eを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmo1eの外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAを加え、100 μ 1の系で同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

約430bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量(m1/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水17μ1に溶解した。得られたPCR反応混合物をNheI及びSalIで消化することにより調製したプラスミドベクターCVIDECに、DNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi - Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培

地 3 m l で 3 7 ℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Pla smid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

EcoT22I認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度CVIDECにサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hva/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hva/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン "a"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号29に示す。また、バージョン "a"のアミノ酸配列を配列番号30に示す。

(ii) ヒト型化H鎖バージョン"b"及び"c"の構築バージョン"b"及び"c"をFRーシャッフリング法によってバージョン"a"のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン"b"ではFR3をヒト抗体234963 (DDBJ、B0 rretzen M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.、91、12917-12921、1994)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FRーシャッフリングプライマーF3RFFS(配列番号31)及びF3RFBS(配列番号32)はセンスDNA配列を有し、F3RFFA(配列番号33)及びF3RFBA(配列番号34)はアンチセンスDNA配列を有する。

F3RFFSとF3RFFAは互いに相補的な配列を有し、両端

にBall及びXholの認識配列を有する。バージョン" c"ではFR3をヒト抗体P0l825 (SWISS-PROT、Poljak RJ.ら, Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FRーシャッフリングベクターF3NMFS(配列番号35)及びF3NMBS(配列番号36)はセンスDNA配列を有し、F3NMFA(配列番号37)及びF3NMBA(配列番号38)はアンチセンスDNA配列を有する。F3RFBSとF3RFBAは互いに相補的な配列を有し、両端にXhol及びNcolの認識配列を有する。

F3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBA、F3NMFS、F3NMBAはPharmacia Biotechicより合成された。F3RFFSとF3RFBAをアニールさせ、それぞれBall及びXhol、Ncol及びXholで消化した。これらをBall及びNcolで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(Ball/Ncol)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb/CVIDECはおり調製に示す。なた、バージョン"b"のアミノ酸配列を配列番号39に示す。また、バージョン"b"のアミノ酸配列を配列番号40に示す。

F3NMFSとF3NMFA、F3NMBSとF3NMBAをアニールさせ、それぞれBalI及びXhoI、NcoI及びXhoIで消化した。これらをBalI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(BalI/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvc/CVIDECと命名した。プラス

ミドhATR5Hvc/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン"c"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号41に示す。また、バージョン"c"のアミノ酸配列を配列番号42に示す。

(i i i i) ヒト型化H鎖バージョン "d"及び "e"の構築 バージョン "d"及び "e"をFRーシャッフリング法によって バージョン "a"のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作 製した。バージョン"d"ではFR3をヒト抗体M62723 (DDBJ、Pa scual V.ら, J. Clin. Invest., 86, 1320-1328, 1990)由来のものに 置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FRーシャッフリングプライマーF3EPS (配列番号43)はセンスDNA配列を有し、F3EPA (配列番号44)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3′ー末端は18bpの相補的配列を有する。

また外部プライマーF 3 Pr S (配列番号 4 5) 及びF 3 Pr A (配列番号 4 6) はFRーシャッフリングプライマーF 3 E P S 及びF 3 E P A とホモロジーを有し、他のFR 3 のシャッフリングにも用いることができる。バージョン "e"ではFR 3 をヒト抗体 Z 8 0 8 4 4 (DDBJ、Thomsett AR.ら、unpublished)由来のものに置換するため、FR 3 をコードする D N A プライマーを 2 個作製した。FRーシャッフリングプライマーF 3 V H S (配列番号 4 7) はセンス D N A 配列を有し、F 3 V H A (配列番号 4 8) はアンチセンス D N A 配列を有し、プライマーの 3 ′ー末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。F 3 E P S、F 3 E P A、F 3 P r S、F 3 P r A、F 3 V H S 及び F 3 V H A は Pharmacia Biotechにより合成された。

PCRは、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を用い、100μ1

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNu Sieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量(m1/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14μ1に溶解した。得られたPCR反応混合物をBa1I及びNcoIで消化し、これらをBa1I及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(Ba1I/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvd/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン "d"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号49に、バージョン "d"のアミノ酸配列を配列番号50に示す。また、プラスミドhATR5Hve/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン "e"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号51に、バージョン "e"のアミノ酸配列を配列番号52に示す。(iv) ヒト型化H鎖バージョン "f"及び"g"の構築

バージョン "a"のFR 3 を別のヒト抗体由来のFR 3 に置換し作製した。バージョン "f"はヒト抗体L04345 (DDBJ、Hillson JL.ら, J. Exp. Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR 3 に、バージョン "g"はS78322 (DDBJ、Bejcek BE.ら, Cancer Res., 55, 2346-2351, 1995) 由来のFR 3 に置換するためFR 3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン "f"のFR ーシャッフリングプライマーF 3 S S S (配列番号 5 3) はセンス D N A 配列を有し、F 3 S S A (配列番号 5 4) はアンチセンス D N A 配列を有し、プライマーの 3′ー末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。

バージョン "g" のFR-シャッフリングプライマーF3CDS(配列番号55)はセンスDNA配列を有し、F3CDA(配列番号56)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3′一末端は18bpの相補的配列を有する。F3SS、F3SSA、F3CDS及びF3CDAは Pharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)を用い、100μ1の反応混合液に1μMのFR-シャッフリングプライマーF3SSS及びF3SSAもしくはF3CDS及びF3CDAをそれぞれ5μ1ずつ、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgC12、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

P C R 法により増幅した D N A 断片を 2 %のNu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。 4~2~4~b~p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切取り、 3~6 量(m~1~/g)の T E を添加し、フェノール抽出、フェ

ノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14μ1に溶解した。得られたPCR反応混合物をBalI及びNcoIで消化し、これらをBalI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(BalI/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvf/CVIDE C及びhATR5Hvg/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvf/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン " f " の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン " f " アミノ酸配列を配列番号57及び58に示す。また、プラスミドhATR5Hvg/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン " g " の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン " g " のアミノ酸配列を配列番号59、60に示す。

(v) ヒト型化H鎖バージョン"h"の構築

バージョン "h"はFR-シャッフリング法によってバージョン "a"のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン "h"はヒト抗体226827 (DDBJ、Van Der Stoep ら, J. Exp. Med., 177, 99-107, 1993)由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン "h"のFR-シャッフリングプライマーF3ADS (配列番号61)はセンスDNA配列を有し、F3ADA (配列番号62)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3′ー末端は18bpの相補的配列を有する。

F 3 A D S 及び F 3 A D A は Pharmacia Biotechにより合成及び 精製された。 P C R は、 K O D D N A ポリメラーゼ(東洋紡績) を用い、 1 0 0 μ 1 の 反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリング

プライマーF 3 A D S 及びF 3 A D A をそれぞれ 5 µ 1 ずつ、 0. 2 m M の d N T P s 、 1. 0 m M の M g C 1 2 、 2. 5 U の K O D D N A ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 9 4 ℃に て 3 0 秒間、 5 0 ℃にて 1 分間、 7 4 ℃にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、 さらに 1 0 0 p m o 1 e の外部プライマーF 3 P r S 及びF 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 2 5 回行った。 P C R 法により増幅した D N A 断片を 2 %の N u Sieve G T G アガロース(F M C Bio. P r o d u c t s)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

424 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量(m 1 / g)の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した B 和 1 日本の B 日本の

(vi) ヒト型化H鎖バージョン"i"及び"j"の構築 バージョン"i"及び"j"はFR-シャッフリング法によって バージョン"a"のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作 製した。バージョン"i"はヒト抗体U95239 (DDBJ、Manhei mer-Lory AJ., unpublished)由来のFR3に、バージョン"j"は

L 0 3 1 4 7 (DDBJ、Collet TA. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 89, 10026-10030, 1992)由来のFR 3 に置換するためFR 3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン "i"のFRーシャッフリングプライマーF 3 MMS (配列番号 6 5) はセンスDNA配列を有し、F 3 MMA (配列番号 6 6) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの 3′ー末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。

バージョン"j"のFRーシャッフリングプライマーF3BMS(配列番号67)はセンスDNA配列を有し、F3BMA(配列番号68)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3′一末端は18bpの相補的配列を有する。F3MMS、F3MMA、F3BMS及びF3BMAはPharmaciaBiotechにより合成及び精製された。PCRは、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer)を用い、100 μ 1の反応混合液に1 μ MのFRーシャッフリングプライマーF3MMSとF3MMA、又はF3BMSとF3BMAをそれぞれ5 μ 1ずつ、0.2 mMのdNTPs、1.5 mMのMgCl2、2.5 UのAmpli Taq Goldを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmo1eの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

P C R 法により 増幅した D N A 断片を 2 %のNu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。 4 2 4 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切取り、 3 倍量(m 1 / g)の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した。 精製した D N A をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 1 4 μ 1 に溶解した。 得られた P C R 反応混合物を B a

I I 及びN c o I で消化し、これらを B a l I 及びN c o I で消化 することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvi/CVIDE C及びhATR5Hvj/CVIDE Cと命名した。プラスミドhATR5Hvi/CVIDE Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン "i"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン "i"アミノ酸配列を配列番号69及び70に示す。また、プラスミドhATR5Hvj/CVIDE Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン "j"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン "j"のアミノ酸配列を配列番号71及び72に示す。

(vii) ヒト型化H鎖バージョン"b1"及び"d1"の構築バージョン"b1"及び"d1"はFRーシャッフリング法によってバージョン"b"及び"d"のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体P01742(SWISS-PROT、Cunningham BA.ら、Biochemistry、9、3161-3170、1970)由来のものに置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FRーシャッフリングベクターF2MPS(配列番号73)はセンスDNA配列を有し、F2MPA(配列番号74)はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBalIの認識配列を有する。

F 2 M P S 、 F 2 M P A は Pharmacia Biotechにより合成及び精製された。 F 2 M P S と F 2 M P A を アニールさせ、 E c o T 2 2 I 及び B a 1 I で消化した。 これを E c o T 2 2 I 及び B a 1 I で消化した。 これを E c o T 2 2 I 及び B a 1 I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a 1 I) 及び h A T R 5 H v d / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a 1 I) に導入し、塩基配列を決定

した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン"b1"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン"b1"アミノ酸配列を配列番号75及び76に示す。また、プラスミドhATR5Hvd1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン"d1"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン"d1"のアミノ酸配列を配列番号77及び78に示す。

(viii) ヒト型化H鎖バージョン"b3"及び"d3"の構築

バージョン "b 3 "及び "d 3 "はFR-シャッフリング法によってバージョン "b"及び "d"のFR 2 を別のヒト抗体由来のFR 2 に置換し作製した。ヒト抗体 280844 (DDBJ、Thomsett AR.ら,unpublished)由来のFR 2 に置換するため、FR 2 をコードするDNAプライマーを 2 個作製した。FR-シャッフリングベクターF2 VHS(配列番号 7 9)はセンスDNA配列を有し、F2 VHA(配列番号 8 0)はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBallの認識配列を有する。F2 VHS、F2 VHAは Pharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

F2VHSとF2VHAをアニールさせ、EcoT22I及びBalIで消化した。これをEcoT22I及びBalIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC(EcoT22I/BalI)及びhATR5Hvd/CVIDEC(EcoT22I/BalI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb3/CVIDEC

及びhATR5Hvd3/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン"b3"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン"b3"アミノ酸配列を配列番号81及び82に示す。また、プラスミドhATR5Hvd3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン"d3"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン"d3"のアミノ酸配列を配列番号83及び84に示す。

(2) ヒト型化抗体 L鎖 V 領域の構築

(i) バージョン"a"

ヒト型化ATR5抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体237332 (DDBJ、Welschof Mら, J. Immunol. Methods, 179, 203-214, 1995)由来のフレームワーク領域を有するヒト型化抗体L鎖(バージョン"a")の作製のために7本のPCRプライマーを使用した。

CDRーグラフティングプライマート5Lv1S(配列番号85)及びト5Lv4S(配列番号86)はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマート5Lv2A(配列番号87)、ト5Lv3A(配列番号88)及びト5Lv5A(配列番号89)はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。外部プライマート5LvS(配列番号90)及びト5LvA(配列番号91)はCDRグラフティングプライマート5Lv1S及びト5LvAにアクラフティングプライマート5Lv1S、ト5Lv4S、ト5Lv2AはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

PCR溶液は、100μ1中に120mM Tris-HC1(

pH8.0)、10mM KC1、6mM (NH,)2 SO,、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgC12、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、5pmo1eのCDRグラフティングプライマート5Lv1S、ト5Lv2A、ト5Lv3A、ト5Lv4S、及びト5Lv5Aを含有する。

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、 94%にて30秒間、50%にて1分間、72%にて1分間の温度 サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフティングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100pmoleの外部プライマーh5LvS及びh5LvAを加え、94%にて30秒間、52%にて1分間、72%にて1分間の温度サイクルを30回行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

PCR反応混合液を 3 % NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース 片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素 SplI(宝酒造)により 3 7 ℃で 4 時間消化した。 この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をこれで沈殿させた後、TE10μ1に溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体上鎖 V領域をコードする遺伝子を含む SplIーBglII DNA断片と SplI及び BglIIで消化することにより調製した CVIDE Cベクターを DNAライゲーションキット ver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 m 1 で 3 7 $^{\circ}$ にて一夜培養し、菌体画分から Q l A prep Spin P la smid Kit (Q I A G EN)を用いてプラスミド D N A を調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM 1 3 P r i m e r M 4 (宝酒造)及びM 1 3 P r i m e r R V (宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体上鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5′ー側にBglII認識配列及びK o z a k 配列、3′ー側にSplI認識配列を持つプラスミドを h A T R 5 L v a / C V I D E C と命名した。ヒト型化上鎖バージョン"a"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)を配列番号92に示す。また、バージョン"a"のアミノ酸配列を配列番号93に示す。また、バージョン"a"のアミノ酸配列を配列番号93に示す。

(ii) バージョン"b"及び"c"

バージョン "b"及び"c"を、バージョン"a"のFR3を置換(FR-シャッフリング)することにより作製した。バージョン"b"にはヒト抗体S68699 (DDBJ、Hougs L ら, Exp.Clin.Immunogen et., 10, 141-151, 1993)由来のFR3を、バージョン"c"にはヒト抗体P01607 (SWISS-PROT、Epp O ら, Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975)由来のFR3をそれぞれ使用した。

バージョン "b"のFR3をコードするプライマーF3SS(配列番号94)とF3SA(配列番号95)、あるいはバージョン "c"のFR3をコードするプライマーF3RS(配列番号96)とF3RA(配列番号97)は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素KpnI及びPstIの認識配列を有する。F3SS、F3SA、F3RS、F3RAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。各100pmo1eのF3SSとF3SA、あるいはF3RSとF3RAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI(宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI(宝酒造)により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

上記のようにして調製したバージョン "b" あるいは "c" のF R 3 をコードする K p n I ー P s t I D N A 断片と K p n I 及び P s t I で消化することにより F R 3 を除去した h A T R 5 L v a / C V I D E C ベクターを D N A ライゲーションキット v e r . 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い 1 6 $\mathbb C$ で 1 時間 反応させ連結

した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ 1に加え、氷上で30分間、42 $\mathbb C$ にて1分間静置した。次いで300 μ 1のHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37 $\mathbb C$ にて1時間インキュベートした後、100 μ g/m1 LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37 $\mathbb C$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3m1で37 $\mathbb C$ にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体上鎖バージョン "a"のFR3を置換したバージョン "b"あるいはバージョン "c"をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれhATR5Lvb/CVIDEC、hATR5Lvc/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lvb/CVIDECに含まれるヒト型化上鎖バージョン "b"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン "b"でまり、酸配列を配列番号98、99に示す。また、プラスミドhATR5Lvc/CVIDECに含まれるヒト型化上鎖バージョン "c"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン "c"のより、101に示す。

(iii) バージョン"b1"及び"b2"

バージョン"bl"及び"b2"を、バージョン"b"のFR2

を置換することにより作製した。バージョン"b1"にはヒト抗体 S65921 (DDBJ、Tonge DWら, Year Immunol., 7, 56-62, 1993)由来のFR2を、バージョン"b2"にはヒト抗体 X93625 (DDBJ、Cox JPら, Eur. J. Immunol., 24, 827-836, 1994)由来のFR2をそれぞれ使用した。

バージョン "b 1" のFR 2 をコードするプライマーF 2 S S (配列番号 1 0 2) とF 2 S A (配列番号 1 0 3) 、あるいはバージョン "b 2" のFR 2 をコードするプライマーF 2 X S (配列番号 1 0 4) とF 2 X A (配列番号 1 0 5) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素 A f 1 II及び S p e I の認識配列を有する。F 2 S S、F 2 S A、F 2 X S 及び F 2 X A は Pharmacia Biotechにより合成された。各 1 0 0 p m o 1 e の F 2 S S と F 2 S A、あるいは F 2 X S と F 2 X A を 9 6 ℃にて 2 分間、 5 0 ℃にて 2 分間処理することによりアニーリングさせ、 2 本鎖 D N A 断片を作製した

これら2本鎖DNA断片を制限酵素Af1II(宝酒造)及びSpeI(宝酒造)により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lvb/CVIDECを制限酵素Af1II (宝酒造)及びSpeI(宝酒造)により37℃で1時間消化した 。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース 片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノー ルで沈殿させた後、TEに溶解した。

上記のようにして調製したバージョン"b1"あるいは"b2"

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ l に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 $^{\circ}$ にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g $^{\prime}$ m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 $^{\circ}$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 4 m 1 で 3 7 $^{\circ}$ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド D N A を調製した。

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体上鎖バージョン "b"のFR2を置換したバージョン "bl"あるいはバージョン "b2"をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ hATR5 Lvb1/CVIDE C及び hATR5 Lvb2/CVIDE Cと命名した。プラスミド hATR5 Lvb1/CVIDE Cに含まれるヒト型化上鎖バージョン "b1"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン "b1"アミノ酸配列を配列番号106及び107に示す。また、プラスミド hATR5 Lvb2/CVIDE Cに含まれるヒト型化

L鎖バージョン"b2"の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン"b2"のアミノ酸配列を配列番号108及び109に示す。

- (3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築
 - (i) ヒト型化H鎖とキメラL鎖との組合せ

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断 片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v a - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断 片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v c / C V I D E C 、 h A T R 5 H v d / C V I D E C 及び h A T R 5 H v e / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、 c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、 c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I に て 消化する ことにより 調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に 導入した。 こうして 作製した プラスミドを h H v c - c h L v / N 5 K G 4 P 、 h H v d - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H

ve-chLv/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v f / C V I D E C 及び h A T R 5 H v h / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、 c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、 c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v f - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v h - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C 及び h A T R 5 H v j / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、 c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、 c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v j - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 1 / C V I D E CをN h e I 及び S a 1 I で 消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、 c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、 c h A T R 5 / N 5 K G 4 Pを N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a 1·I / N h e I) に導入した。こうして作 製したプラスミドを h H v b 1 - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v d 1 - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

(ii)ヒト型化L鎖とキメラH鎖との組み合わせ 抗体発現ベクターN5KG4Pを用いて、キメラH鎖との組み合

わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価 を行った。

プラスミドトATR5Lva/CVIDEC、hATR5Lvb/CVIDEC、hATR5Lvc/CVIDEC、hATR5Lvb1/CVIDEC、hATR5Lvb1/CVIDECを制限酵素Bg1Ⅱ(宝酒造)及びSp1I(宝酒造)により37℃で2~3時間消化した。消化混合物を1.5%または2% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含むSplI-BglI DNA断片とSp1I及びBglIで消化したchATR5Hv/N5KG4PをDNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16 $^{\circ}$ で1時間反応させ連結した。

連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 1 0 0 μ 1 に加え、氷上で 3 0 分間、 4 2 \mathbb{C} にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ 1 の Hi - Competence Broth (ニッポンジーン)を加え 3 7 \mathbb{C} にて 1 時間 インキュベートした後、 1 0 0 μ g / m 1 L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 3 7 \mathbb{C} にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体をLBA培地250m1または500m1で37 ℃にて一夜培養し、菌体画分からPlasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L 鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれchHvhLva/N5KG4P、chHv-hLvb/N5KG4P、c

h H v - h L v c / N 5 K G 4 P、 c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

(iii) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の c D N A 断 片を回収し、ヒト型化 A T R - 5 抗体 L 鎖バージョン "a" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v a / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した h L v a / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製した プラスミドを h H v a - h L v a / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C 及び h A T R 5 H v c / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体 L鎖バージョン "a" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v a / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した h L v a / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - h L v a / N 5 K G 4 P 及び h H v c - h L v a / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C 、 h A T R 5 H v d / C V I D E C 及び h A T R 5 H v e / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化 A T R - 5 抗体 L鎖バージョン "b" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I)に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - h L v b / N 5 K G 4 P 、 h H v d

- h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v e - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v f / C V I D E C 、h A T R 5 H v g / C V I D E C 及び h A T R 5 H v h / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化H鎖 V 領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体 L鎖バージョン "b" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I)に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v f - h L v b / N 5 K G 4 P 、 h H v g - h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v h - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C 及び h A T R 5 H v j / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体 L 鎖バージョン "b" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i - h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v j - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 1 / C V I D E CをN h e I 及び S a 1 I で 消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化 A T R - 5 抗体L鎖バージョン "b" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I に て 消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a 1 I /

NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb1-hLvb/N5KG4P及びhHvd1-hLvb/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で 消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体 L鎖バージョン "b" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I に て 消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b 3 - h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v d 3 - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化H鎖 V 領域の c D N A 断 片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体 L 鎖バージョン "b 1"及び "b 2" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a 1 I にて消化することにより調製した h L v b 1 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) 及び h L v b 2 / N 5 K G 4 P (S a 1 I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び h H v b - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C を N h e I 及び S a 1 I で消化し、ヒト型化 H鎖 V 領域の c D N A 断 片を回収し、ヒト型化 A T R - 5 抗体 L鎖バージョン "b 1" 及び "b 2" c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P を N h e I

及びSalIにて消化することにより調製したhLvbl/N5KG4P(SalI/NheI)及びhLvb2/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvi-hLvb1/N5KG4P及びhHvi-hLvb2/N5KG4Pと命名した。

(4) СОЅ-7細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記 発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターをGene Pulser装置 (Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/m1の細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞 0.78m1に、プラスミド 50μ gあるいは 20μ gを加え、1,500 V, 25μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO) を含有するDMEM培地(GIBCO) に懸濁し、10cm培養皿あるいは15cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO(アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5)抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からの抗体の精製をAffiGel Protein A MAPSIIキット(Bio-Rad)、あるいはrProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech)を用いて行った。AffiGel Protein A MA PSIIキットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rPro

tein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

1 m l のrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充塡し、1 0 倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7 細胞の培養上清をアプライした後、1 0 倍量のTBSによってカラムを洗浄した。次に13.5 m l の2.5 m M HCl(pH3.0)を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5 m l の l M Tris-HCl(pH8.0)を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ30もしくは100(amicon)を用いた限外濾過を2~3回行うことにより、TBSに溶媒を置換し、最終的に約1.5mlまで濃縮した。

実施例4. 抗体の定量及び活性評価

(1) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp、NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO。、0.02% NaN。、pH9.6)(以下、CBと称す)で1 μ g/m1の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgGγ抗体(BioSource)100 μ 1で固相化し、200 μ 1の希釈バッファー(50mM TrisーHC1、1mM MgC12、0.1M NaC1、0.05% Tween20、0.02% NaN。、1% ウシ血清アルブミン(BSA)、pH8.1)(以下DBと称す)でブロッキングの後、抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートし0.05%Tween20を含むダルベッコPBS(以下RBと称す)で洗浄後、DBで1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞」82(ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10 6個の」82細胞を播き込んだ。これを CO_2 インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、 $300\mu1$ のPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に $100\mu1$ 加え、氷上で10%

PFA/PBSを捨て、 300μ 1のPBSで各穴を2回洗浄後、 250μ 1のDBでブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して 100μ 1を各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100μ 1を加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(3)中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎

盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) による Factor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、1. 25 mg/mlのThromborel S 10μ lと適当な濃度に希釈した抗体 10μ lに緩衝液(5 mMのCaCl2、0. 1 %のBSAを含む TBS) 60μ lを加え、96 穴プレート中で室温で1時間反応させた。これに3. 245μ g/mlのヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び82. 5 ng/mlのヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ 10μ l加え、さらに室温で1時間反応させた。

 $0.5\,\text{MoEDTA}$ を $10\,\mu\,1$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\,\mu\,1$ 加え、Microplate Reader(Bio Rad)で $40\,$ 5 $/655\,$ n mの吸光度を測定した。室温で1時間反応させ、再度 $405/655\,$ n mの吸光度を測定した。抗体無添加の1時間の吸光度変化を $100\,$ %の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix)を添付文書に従い溶解し、精製水で 2 倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

- (4)活性の評価
- (i) ヒト型化H鎖バージョン"a"とキメラL鎖との組合せヒト型化H鎖バージョン"a"とキメラL鎖を組み合わせた抗体(a‐ch)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた(図1)。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体(ch‐ch)に比べて弱い活性であった(図2)。よってヒト型化H鎖はFR-シャッフリングによるバージョンアップを行う

ことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(ii) ヒト型化L鎖バージョン "a"とキメラH鎖との組合せヒト型化L鎖バージョン "a"とキメラH鎖を組み合わせた抗体(ch-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた(図1)。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性であった(図2)。よってヒト型化L鎖もFRーシャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(i i i) ヒト型化H鎖バージョン "a" とヒト型化L鎖バージョン "a" との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン "a" とヒト型化L鎖バージョン "a" を組み合わせた抗体(aーa)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた(図3)。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった(図4)。よってヒト型化H鎖及びL鎖のFRーシャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOSー7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。(iv)ヒト型化H鎖バージョン "b"、"c"及び"d"とキメラL鎖との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H 鎖とキメラL鎖を組み合わせた抗体(それぞれ"b-ch"、"c-ch"、及び"d-ch")を作製し、cell ELISAに て抗原結合能を調べたところ、"d-ch"はキメラ抗体と同等の

抗原結合活性が認められ、"b-ch"及び"c-ch"はわずかに劣る抗原結合活性を示した(図5,6)。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、"b-ch"はほぼ同等、"d-ch"はわずかに弱い活性であった。またバージョン"c-ch"はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図7)。よってヒト型化H鎖バージョン"b"及び"d"がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

(v) ヒト型化H鎖バージョン"b"とヒト型化L鎖バージョン"a"との組合せ

FRーシャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン "b"とヒト型化L鎖バージョン "a"を組み合わせた抗体(bーa)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する結合量が低下していた(図5)。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった(図8)。よって"bーa"が"aーa"より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(vi) ヒト型化L鎖バージョン"b"、"c"とキメラH鎖との 組合せ

ヒト型化L鎖バージョン"b"及び"c"をキメラH鎖と組み合わせた抗体(それぞれ、"ch-b"、"ch-c")を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した(図9及び10)。よってバージョン"b"及び"c"をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン"b"の方がバージョン"c"より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いた

キメラ抗体はCHO細胞DG44で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。
(vii) ヒト型化H鎖バージョン"b"とヒト型化L鎖バージョン"b"及び"c"との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン"b"をヒト型化L鎖バージョン"b"及び"c"と組み合わせた抗体(それぞれ"b-b"及び"b-c")を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した(図11及び12)。

(viii) ヒト型化H鎖バージョン"b"及び"d"とヒト型化 L鎖バージョン"b"との組合せ

FRーシャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H 鎖とヒト型化L鎖バージョン"b"を組み合わせた抗体(それぞれ "b-b"及び"d-b")を作製し、cell ELISAにて 抗原結合能を調べたところ、"d-b"はキメラ抗体と同等の抗原 結合活性が認められ、"b-b"は高濃度でわずかに劣る抗原結合 活性を示した(図13)。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗 体に比べて、"b-b"はわずかに弱い活性で、"d-b"はキメ ラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図14)。よって"b-b"は抗原活性中和能の高いバージョン、"d-b"は抗原結合能の 高いバージョンであることが示された。

(ix) ヒト型化H鎖バージョン "e"とキメラL鎖及びヒト型 化L鎖バージョン "b"との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン "e"をキメラL鎖及びヒト型化バージョン "b"と組み合わせた抗体(それぞれ "e-ch"及び"e-b")を作製したところ、 "e-ch"の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、 "e-b"は抗体の発現量が非常に低く

、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた(図15)。また "e-ch"の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図16)。よってH鎖バージョン "e"はL鎖バージョン "b"との組合せが悪いと考えられた。

(x) ヒト型化H鎖バージョン "f"、"g"及び"h"とヒト型化L鎖バージョン "b"との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン "f"、"g"及び"h"をヒト型化L鎖バージョン"b"と組み合わせた抗体を(それぞれ"f-b"、"g-b"及び"h-b")作製したところ、"f-b"及び"h-b"の抗体は抗体の発現量が非常に低くかった。なお、バージョン"f"、"h"についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。"g-b"は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した(図17)。"g-b"の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図18)。

(xi) ヒト型化H鎖バージョン "bl"及び "dl"とヒト型化 L鎖バージョン "b"との組合せ

ヒト型化日鎖バージョン"bl"及び"dl"をヒト型化L鎖バージョン"b"と組み合わせた抗体を(それぞれ"bl-b"及び"dl-b")作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

(x i i) ヒト型化H鎖バージョン "b 3"及び "d 3" とヒト型 化L鎖バージョン "b"との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン"b3"及び"d3"をヒト型化L鎖バージョン"b"と組み合わせた抗体を(それぞれ"b3-b"及び"d3-b"の抗原結合能はキメ

ラ抗体よりわずかに劣っており、"b3-b"の抗原結合能はさらに劣っていた(図19)。"b3-b"の抗原中和能は"b-b"より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、"d3-b"は"b-b"と同程度の活性にとどまった(図20)。(xiii)ヒト型化H鎖バージョン"i"及び"j"とキメラ上鎖及びヒト型化L鎖バージョン"b"との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン "i"及び"j"をキメラL鎖と組み合わせた抗体(それぞれ"iーch"及び"jーch")とヒト型化L鎖バージョン"b"と組み合わせた抗体(それぞれ"iーb"及び"jーb")を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した(図21、22)。 "iーch"にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、"jーch"の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図23)。"iーb"はキメラ抗体と同等の活性が認められ、"jーb"はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図24)。

(xiv) ヒト型化L鎖バージョン"b1"及び"b2"

ヒト型化上鎖バージョン "b 1"及び "b 2"をキメラH鎖と組み合わせた抗体(それぞれ、"ch-b1"及び"ch-b2")を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した(図25)。抗原中和能については、"ch-b1"ではキメラ抗体と同等の活性を示し、"ch-b2"では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた(図26)。バージョン"b1"及び"b2"ともにヒト型化抗体上鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン"b2"の方が優れている。

(xv)ヒト型化H鎖バージョン"b"とヒト型化L鎖バージョン

"b2"との組合せ

ヒト型化日鎖バージョン "b"をヒト型化L鎖バージョン "b2"と組み合わせた抗体("b-b2")を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた(図27)。抗原中和能は"b-b"の活性を上回ったものの、"i-b"の活性には及ばなかった(図28)。

(xvi) ヒト型化H鎖バージョン "i" とヒト型化L鎖バージョン "b 1" 又は "b 2" との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン"i"をヒト型化L鎖バージョン"b1"又は"b2"と組み合わせた抗体(それぞれ"i-b1"及び"i-b2")を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。"i-b2"の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、"i-b1"及び"t-b2"の抗原中和能はキメラ抗体や"i-b"を上回る活性を示し、"i-b2">"i-b1"の順に強かった(図30)。実施例5. CHO細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価(1)CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体(b-b、i-b及びi-b2)の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したCHO細胞(DG44)に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

プラスミドDNA、hHvb-hLvb/N5KG4P、hHvi-hLvb/N5KG4P及びhHvi-hLvb2/N5KG4Pを制限酵素SspI(宝酒造)で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポーレーション装置(Gene Pulser; Bio Rad)により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに1×10′/mlの細

胞密度で懸濁し、この懸濁液約0.8m1に前記のDNAを10もしくは 50μ gを加え、 $1,500V,25\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、ヒポキサンチンーチミジン(GIBCO)(以下、HT)を含有するCHO-S-SFMII培地に処理された細胞を懸濁し、2枚の96穴平底プレート(Falcon)に100μ1/穴となるように播種し、CO₂インキュベーターにて培養した。培養開始8~9時間後にHT及び1mg/m1のGENETICIN(GIBCO)を含有するCHO-S-SFMII培地を100μ1/穴加え、500μg/m1のGENETICIN選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3~4日に一度1/2量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約2週間経過した時点で、その4~5日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定ELISAにより測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

(2) ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体("b-b"、"i-b"及び"i-b2")発現DG44細胞株を2Lローラーボトル(CONING)を用い、500m1/ボトルのCHO-S-SFMII培地中で数日培養後、培養液を回収して新鮮なCHO-S-SFMII培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、 0.22μ mもしくは 0.45μ mのフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約2Lの培養上清を得た。得られた培養上清を Protein Aアフィニティーカラム(Poros)を接続したConSepLC100システム(ミリポア)にて抗体を精製した。

(3) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴をCBで1 μ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ 1で固相化し、200 μ 1のDBでブロッキングの後、抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ 1を加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、基質溶液を100 μ 1加え、405/655 nmでの吸光度をmicroplate reader(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスタンダードとしてIgG4 κ (The Binding Site)を用いた。

(4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCe11 ELISAプレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82(ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートに1×106 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO2インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、PBSで各穴を2回洗浄した。PFA/PBSを各穴に100μ1加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

PFA/PBSを捨て、 $300\mu1$ のPBSで各穴を2回洗浄後、 $250\mu1$ のDBでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、DBにて 10μ g/mlより公比2で段階希釈して 100μ 1を各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤ

ギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100μ 1を加えた。室温にて 1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を 100μ 1加え、次に 405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(5) TF中和活性(ファクターXa産生阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクター X a 産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel $S(Behringwerke\ AG)$ による Factor X a 産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5 m g / m 1 の Th romborel S 10 μ 1 と抗体 10 μ 1 に緩衝液(5 m M の C a C1 2 、 0 . 1 % の B S A を含む T B S) 6 0 μ 1 を加え、9 6 穴プレート中で室温で1時間反応させた。抗体は緩衝液で 2 0 0 μ g / m 1 より公比 5 で段階希釈した。

これに 3.245μ g / m 1 のヒトファクター X (セルサス・ラボラトリーズ) 及び 82.5 n g / m 1 のヒトファクター V I I a (エンザイム・リサーチ)をそれぞれ 10μ 1 加え、さらに室温で45分間反応させた。0.5 Mの E D T A e 10μ 1 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50μ 1 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で 405/655 n m の吸光度を測定した。室温で30 分間反応させ、再度 405/655 n m の吸光度を測定した。 抗体無添加の30 分間の吸光度変化を100 %の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-222 (Chromogenix)を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液(0.6mg/ml へキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

(6) TF中和活性(ファクターX結合阻害活性)の測定 ヒト型化抗体のファクターX結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロ

ンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) を用い、予めTFとFactor VIIaの複合体を形成させ、その複合体の Factor Xa産生阻害活性を指標にファクター X 結合阻害活性を測定した。すなわち、5 m g / m l の Thromborel S l 0 μ l と 8 2. 5 n g / m l の E ト F a c t o r V I I a (エンザイム・リサーチ) 1 0 μ l に緩衝液(5 m M の C a C l 2、0. 1%の B S A を含む T B S)60 μ l を加え、96 穴プレート中で室温で予め 1 時間反応させた。

これに抗体溶液を $10\mu1$ 加え、室温で5分間反応させた後、 $3.245\mug/m1$ のヒトFactor X (セルサス・ラボラトリーズ)を $10\mu1$ 加え、さらに室温で45分間反応させた。なお抗体は緩衝液で $200\mug/m1$ より公比2で段階希釈した。0.5MのEDTAを $10\mu1$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\mu1$ 加え、Microplate Reader(BioRad)で<math>405/655nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-222 2 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液($0.6 \, mg/ml$ へキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1 で混和し調製した。

(7) TF中和活性(血漿凝固阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のTF中和活性(血漿凝固阻害活性)はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel $S(Behringwerke\ AG)$ を用いたプロトロンビン時間を指標に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿(コスモ・バイオ) $1\ 0\ 0\ \mu$ 1 を入れ、これに様々な濃

度に希釈した抗体を $50\mu1$ 加え、 37 でで 3 分間加温した。予め 37 でに加温しておいた 1.25 m g / m 1 の Thromborel Sを 50 $\mu1$ 加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間は Amelung CR-Aを接続した Amelung KC-10A(ともにエム・シー・メディカル)にて測定した。

抗体は80μg/mlより公比2で0.1%のBSAを含有するTBS(以下、BSA-TBS)にて段階希釈した。測定した抗体無添加の疑固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその疑固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、 50μ 1に 50μ 1のBSA-TBSを加え、37℃で3分間加温し、予め<math>37℃に加温しておいたヒト血漿を 100μ 1加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは6.25mg/m1より公比2で25mMのCaC12を含むハンクス緩衝液(GIBCO)にて段階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

(8)活性の評価

<u>実施例 6.</u> <u>BIACOREを用いたTFと抗TF抗体</u>の相互作用

における反応速度論的解析

BIACOREを用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。組換型ProteinGをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合させた。抗原として精製した組換型TF(1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶型TF)(以下、可溶型TFと称す)を用い、種々の濃度に調製した可溶型TFをアナライトとした。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター(解離速度定数kdiss及び結合速度定数kass)を算出した。速度論的解析に関して、「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(karlsson, R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.)を参考にした。

(1) センサーチップへの Protein Gの固相化

センサーチップCM5 (BIACORE) へProtein G (2YMED) を固相化する。

ランニングバッファーとしてHBS-EP 緩衝液(0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% ポリソルベート 20(v/v))(B IACORE)を用い、流速は 5μ L/分とした。センサーチップ CM5 上のカルボキシメチルデキストランのカルボキシル基を 100μ L 0.05M N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)/0.2 M 塩酸 $N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)のインジェクトにより活性化した。引き続き、<math>10\mu$ Lの 50μ g/mL Protein Gをインジェクトし、これを3回行って固相化した。 Protein Gは10mg/mlになるように10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)にて 50μ g/mLに希釈し

調製した。さらに 100μ Lの1.0Mエタノールアミンー塩酸(pH8.5)をインジェクトし、過剰の活性基をブロックした。これに 10μ Lの0.1Mグリシンー塩酸緩衝液(pH2.5)および 10μ Lの10m M塩酸をインジェクトし、非共有結合している物質を洗浄した。これを各フローセルについて行い、72n Mのヒト型化抗TF抗体バージョン"ib2"を 10μ Lインジェクトし、約1000R U結合することを確認した。

(2) 固相化抗TF抗体とヒトTFとの相互作用

ヒトTFは、アミノ酸配列1-219のC末端にFLAGペプチドを連結させたものをCHO細胞にて発現させて精製した。これを可溶型ヒトTFとして用いた。

以上のことをフローセルの1~3それぞれで行った。

(3)相互作用の速度論的解析

目的のデータファイルを読み込み、目的の反応領域について、HBS-EP 緩衝液のセンサーグラムをベースラインとして、重ね書きによる反応パターンの比較を行った。さらにカーブフィッティングによるカイネティクスパラメーター(結合速度定数 k a s s 及び解離速度定数 k d i s s)の算定を行う BIACORE専用の解析アプリケーションソフトウェアである「BIAevaluation 2.1」(Pharmacia)を用いて、相互作用の速度論的解 析を行った。なお、結合速度定数 k a s s を求める際には、解析モデルタイプ 4 を用いた(BIAevaluation 2.1 Software Hand book、A1~A5)。それぞれのフローセルから算出した値から、各種抗体のカイネティクスパラメーターを得た。結果(各フローセルから算出した値の平均値生標準偏差)を表6に示す。

表 6 キメラ及びヒト型化抗 T F 抗体のカイネティクスパラメーター (n = 3)

	キメラ	b-b	i-b	i -b2
kdiss [×10 ⁻⁴ 1/s]	5.06 ± 0.12	9.52±0.22	6.49±0.17	6.35±0.15
kass [×10 ⁵ 1/Ms]	4.65±0.32	4. 15±0. 27	4.67±0.30	5. 44±0. 36
KD [×10 ⁻⁹ M]	1.09±0.09	2.30 ± 0.15	1.39±0.13	1.17±0.11

実施例7. ヒト型化抗TF抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットブロットハイブリダイゼーション法(「改訂版分子生物学研究のためのタンパク実験法」(羊土社)竹縄忠臣/編 p.101)によって、非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TFへの反応性を検討した。TFは細胞外領域にFLAGタグを付したものをCH〇細胞にて発現させ、精製したもの(shTF)を用いた。shTFをそれぞれ次の3種の緩衝液(緩衝液A:10mM Tri

s-HCl, pH8.0; 緩衝液B:10mM Tris-H C1, pH8.0, 8M 尿素; 緩衝液C:10mM Tr is-HCl, pH8.0, 8M 尿素, 5mM DTT) にて希釈した。緩衝液Aで処理したものは非変性TFであり、一方 、非還元下変性TFは緩衝液Bで処理し、還元下変性TFは緩衝液 Cで処理して調製した。それぞれのサンプルは室温で24時間処理 した。処理後、ニトロセルロース膜(Bio-Rad)にサンプル をブロッティングした。サンプルを 0. 5 μ 1、1 μ 1 及び 2 μ 1 (3 μg/ml) 膜にブロットし、膜を風乾した。 DB (5 0 mM Tris-HC1, pH8.1, 0.15M NaC1, 1 $mM M g C l_2$, 0.05% (v/v) Tween 20. 0. 02% (w/v) NaN₃, 1% (w/v) BSA) でブロッキングした。膜をヒト型化抗TF抗体を含むDBもしくは DB (コントロール) で反応させた。 0. 05% (v/v) Tween 20を含むPBSで洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト I g G 抗体 (D A K O) を含む D B で 反応させた。 0. 05% (v /v) Tween 20を含むPBSで洗浄した後、ECL Wester n Blotting reagent (Amersham) で処理し、X線フィルムに30秒 間暴露させた。

図35に示したようにキメラ型抗TF抗体及びヒト型化抗TF抗体(バージョン"bb""ib"及び"ib2")は非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TF全てに反応した。

<u>実施例 8.</u> ラット急性 DICモデルにおける抗血栓作用の確認

抗TF抗体の抗血栓作用について、ラットを用いたトロンボプラスチン誘発DIC モデルで確認した。すなわち、SD系雄性ラットにヒトトロンボプラスチン溶液を40mg/kg の用量で3時間かけて静脈内に持続注入することでDIC モデルを作製した。抗TF抗体(キメラおよ

びヒト型化抗TF抗体i-b2)は各々0.2mg/kgの用量でトロンボプラスチン溶液の注入開始5分前に静脈内投与した。トロンボプラスチン溶液の持続注入終了15分後に腹部大動脈からクエン酸加血液を採取し、血小板数、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)、フィブリノーゲン濃度(Fib)、可溶性フィブリンモノマー複合体(sFMC)濃度、トロンビン/アンチトロンビンIII複合体(TAT)濃度を測定した。

その結果、表7に示すように、トロンボプラスチンの持続注入により血小板数の減少、aPTTの延長、フィブリノーゲン濃度の減少、sFMCおよびTAT 濃度の上昇が認められ、明らかな凝固亢進状態を呈した。これに対し、キメラおよびヒト型化抗TF抗体はともにこれらの変化をほぼ同様に強く抑制した。

この結果から、ヒト型化抗TF抗体は抗血栓薬として有用なことが示された。

表 7

測定項目	トロンボプラ スチン非投与 正常群	溶媒投与 対照群	キメラ抗体 投与群	ヒト型化抗体 投与群
血小板数 (x10 ⁴ /mm³)	115.5±11.8	82.9±14.3	100.7±12.9	96. 1±13. 3
aPTT(sec)	20.1±1.1	36.2±13.9	22. 3±0. 7°1	21.8±1.3ª1
フィブリノーゲン濃度 (正常群を100%)	100.0±4.2	64.8±20.0	101.0±6.6ª	98.9±5.7°
sFMC濃度 (μg/ml)	74.2±5.5	3517±3645	129. 9±46. 8 ^a	66. 5±23. 0 ^{a)}
TAT濃度 (ng/ml)	3. 4±0. 6	29.6±31.0	3.8±0.7 ^{b)}	4. 2±0. 9

(平均值土標準偏差)

溶媒投与対照群に対する差の有意性:a):p<0.01, b):p<0.05

参考例1. 抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法(Ito, T.ら J. Bio chem. 114, 691-696, 1993)に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10mM塩化ベンザミジン、1mMフッ化フェニルメチルスルフォニル、1mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS, pH 7.5)中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

この上清から Concanavalin A-Sepharose 4Bカラム(Pharmacia) および抗TF抗体を結合させたSepharose 4 Bカラム(Pharmacia) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜(PM-10, Amicon) で濃縮し、精製標品として4℃で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体(American Diagnostica)とポリクローナル抗体(American Diagnostica)を組合せたSandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF(約70μg/ml)を等容量のFreundの完全アジュバント(Difco)と混合後、5週齢のBalb/c系雄性マウス(日本チャールスリバー)の腹部皮下に、TFとして10μg/マウスとなるように免疫した。12,18及び25日にはF

reundの不完全アジュバントと混合したTFを5μg/マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日にPBSで 希釈したTF溶液を5μg/マウスで腹腔内投与した。

最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で 1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地(以下RPMI-培地とする)(Lifetech or iental) に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴(約400個/穴)播種した。融合後、1,2,3,5日目に培地の半量をHAT(大日本製薬)およびcondimed H1(Boehringer Mannheim GmbH)を含むRPMI-培地(以下HAT-培地とする)に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは 2 回の限界 希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはHAT-培地からRPMI-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、TF/ファクターVIIa複合体とファクターXとの結合を強く阻害する抗体6種(ATR-2、3、4、5、7及び8)を産生するハイブリドーマが樹立できた。

3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、in vitroで継代したハイブリドーマ10°個を、あらかじめ鉱物油を2回腹腔内に投与しておいたBa1b/c系雄性マウス

の腹腔内に移植した。移植後1~2週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、 Protein Aカラム (日本ガイシ) を装着した ConSepLC100システム(Millipore) を用いて行った。

4. Cell-ELISA

TFを高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株 J82 (Fair D.S.ら、J. Biol. Chem., 262, 11692-11698, 1987) をATCCより導入し、RPMI-培地中、37℃、5%CO2、100%湿度の条件で継代・維持した。

Cell-ELISA用プレートは、96穴プレートにJ82細胞を 10^5 個/穴の濃度で播種し、上記条件で1日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液(PFA)を加えて氷冷下で10分静置することで固定化することによって作製した。PFAを除去し、PBSで洗浄後、1%BSAおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むTris 緩衝液(Blocking緩衝液)を加えて、使用時まで4%で保存した。

Cell-ELISAは以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートからBlocking緩衝液を除去し、抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で1.5時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウスIgG(H+L)(Zymed)を1時間反応させ、洗浄後、1mg/mlのp-ニトロフェニルホスフェートニナトリウム(Sigma)を添加して1時間後に405nmにおける吸光度を測定することで、J82細胞に結合した抗TF抗体量を定量した。

5. ファクター X a 活性を指標とした T F 中和活性測定系

1 1 4

 $50\mu1005$ mM $CaCl_2$ および0.1%ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS:pH7.6)に $10\mu10$ ヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液(5 mg/ml)(ThromborelS)(Boehring)と $10\mu100$ ファクターVIIa 溶液(82.5 ng/ml)(American Diagnostica)を添加し、室温で1 時間反応させることでTF/FactorVIIa 複合体を形成させた後、 $10\mu100$ 所定濃度に希釈した抗TF 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および $10\mu100$ Factor X溶液(3.245μ g/ml)(Celsus Laboratorise)を添加して45 分間反応させ、0.5M ED TA を $10\mu10$ 行流加することで反応を止めた。ここに2 mM S-222 溶液(第一化学薬品)を $50\mu1$ 添加し、30 分間の405 nmにおける吸光度変化をもってTF00 Factor X1 を X2 の結合を阻害する抗体の活性は測定できる。

6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿(コージンバイオ)を用い、この 100μ 1に適当に希釈した抗TF抗体溶液 50μ 1を混和して37℃で $3分間反応させた後、<math>50\mu$ 1のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液(1.25mg/ml)を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置(CR-A:Amelung)で測定した。

7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクロナール抗体アイソタイピングキット (Amersham社製)を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を下に示した。

表 8

抗TFモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ A T R -2 I g G 1, k

ATR-3 I g G 1, k
ATR-4 I g G 1, k
ATR-5 I g G 1, k
ATR-7 I g G 2 a, k
ATR-8 I g G 2 a, k

参考例2. 可溶型ヒトTFの作製法

可溶型ヒトTF(shTF)は以下のように作製した。

ヒトTFの貫通領域(220番目のアミノ酸)以下をFLAGペプチドM2に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター(ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子を含む)に挿入し、CHO細胞に導入した。ヒトTFのcDNA配列はJames H. Morrisseyらの報告(Cell(1987) 50, 129-135)を参考にした。この可溶型ヒトTFの遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号151に示した。G418により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、shTF発現細胞を樹立した。

この細胞を無血清培地 C H O - S - S F M II (G I B C O) で培養し、shTFを含む培養上清を得た。同容量の40mMトリス塩酸緩衝液(p H 8.5)で2倍に希釈し、20mMトリス塩酸緩衝液(p H 8.5)で平衡化した Q-Sepharose Fast Flowカラム(100mL, Pharmacia Biotech)に添加し、0.1M NaClを含む同緩衝液で洗浄後、NaClの濃度を0.3Mとし、shTFをカラムから溶出した。得られたshTF 画分に終濃度2.5Mとなるように硫酸アンモニウムを加え、遠心操作(10,000rpm、20分)により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清をButyl TOYOPEARL(30mL,TOSOH)に添加し、2.5Mの硫酸アンモニウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液(p H 6.8)で洗浄した。5

配列表フリーテキスト

配列表の<223>に記載した内容は次の通りである。

配列番号:1:プライマーMHC-G1

配列番号: 2: プライマーMHC-G2 a

配列番号: 3: プライマーMKC

配列番号: 4: M 1 3 プライマーM 4

配列番号: 5: M 1 3 プライマーR V

配列番号: 6:抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2のH

鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基

配列

配列番号:7:抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3のH

鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基

配列

配列番号:8:抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4のH

鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基

配列

配列番号:9:抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5のH

鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基 配列

配列番号:10:抗一TFマウスモノクローナル抗体ATR-7の H鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 11: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8の H鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 1 2 : 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2の L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 13: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3の L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 14: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4の L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 15: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5の L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号:16:抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7の 上鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 17: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8の L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする 塩基配列

配列番号: 18: プライマー ch 5 H S

配列番号:19:プライマーch5HA

配列番号: 20:プライマーch5LS

配列番号:21:プライマーch5LA

配列番号: 2 2 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 1

S

配列番号: 23: CDRグラフィティングプライマーhR5Hv2

8

配列番号: 2 4: CDRグラフィティングプライマーhR5Hv4

S

配列番号: 25: CDRグラフィティングプライマーhR5Hv3

Α

配列番号:26:CDRグラフィティングプライマーhR5Hv5

Α

配列番号: 27:プライマーhR5HvPrS

配列番号: 28: プライマーhR5HvPrA

配列番号:29:ヒト型化H鎖V領域バージョン"a"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:30:ヒト型化H鎖V領域バージョン"a"のアミノ酸

配列

配列番号:31:FRシャッフリングプライマーF3RFFS

配列番号:32:FRシャッフリングプライマーF3RFBS

配列番号:33:FRシャッフリングプライマーF3RFFA

配列番号:34: FRシャッフリングプライマーF3RFBA

配列番号:35:FRシャッフリングプライマーF3NMFS

配列番号:36:FRシャッフリングプライマーF3NMBS

配列番号:37:FRシャッフリングプライマーF3NMFA

配列番号:38:FRシャッフリングプライマーF3NMBA

配列番号: 39:ヒト型化H鎖V領域バージョン"b"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 40:ヒト型化H鎖V領域バージョン"b"のアミノ酸

配列

配列番号: 41:ヒト型化H鎖V領域バージョン"c"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 42:ヒト型化H鎖V領域バージョン "c"のアミノ酸

配列

配列番号:43:FRシャッフリングプライマーF3EPS

配列番号:44:FRシャッフリングプライマーF3EPA

配列番号: 45: プライマーF3PrS

配列番号: 46: プライマーF3PrA

配列番号:47:FRシャッフリングプライマーF3vHS

配列番号:48:FRシャッフリングプライマーF3vHA

配列番号:49:ヒト型化H鎖V領域バージョン"d"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:50:ヒト型化H鎖V領域バージョン "d"のアミノ酸

配列

配列番号:51:ヒト型化H鎖V領域バージョン"e"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 52:ヒト型化H鎖V領域バージョン "e" のアミノ酸

配列

配列番号:53:FRシャッフリングプライマーF3SSS

配列番号:54:FRシャッフリングプライマーF3SSA

配列番号:55:FRシャッフリングプライマーF3CDS

配列番号:56:FRシャッフリングプライマーF3CDA

配列番号: 57:ヒト型化H鎖V領域バージョン"f"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:58:ヒト型化H鎖V領域バージョン"f"のアミノ酸

配列

配列番号:59:ヒト型化H鎖V領域バージョン"g"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 60:ヒト型化H鎖V領域バージョン"g"のアミノ酸

配列

配列番号: 61: FRシャッフリングプライマーF3ADS

配列番号:62:FRシャッフリングプライマーF3ADA

配列番号: 63:ヒト型化H鎖V領域バージョン"h"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 64:ヒト型化H鎖V領域バージョン"h"のアミノ酸

配列

配列番号: 65: FRシャッフリングプライマーF3MMS

配列番号: 66: FRシャッフリングプライマーF3MMA

配列番号: 67: FRシャッフリングプライマーF3BMS

配列番号:68:FRシャッフリングプライマーF3BMA

配列番号: 69:ヒト型化H鎖V領域バージョン "i" のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 70:ヒト型化H鎖V領域バージョン"i"のアミノ酸

配列

配列番号:71:ヒト型化H鎖V領域バージョン"i"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:72:ヒト型化H鎖V領域バージョン"i"のアミノ酸

配列

配列番号: 73: FRシャッフリングプライマーF2MPS

配列番号:74:FRシャッフリングプライマーF2MPA

配列番号: 75:ヒト型化H鎖V領域バージョン"b1"のアミノ

酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 76:ヒト型化H鎖V領域バージョン "b1" のアミノ

酸配列

配列番号: 77: ヒト型化H鎖V領域バージョン "dl" のアミノ

酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 7 8: ヒト型化 H 鎖 V 領域バージョン "d 1" のアミノ

·酸配列

配列番号:79:FRシャッフリングプライマーF2VHS

配列番号:80:FRシャッフリングプライマーF2VHA

配列番号:81:ヒト型化H鎖V領域バージョン"b3"のアミノ

酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 82:ヒト型化H鎖V領域バージョン "b3" のアミノ

酸配列

配列番号: 83:ヒト型化H鎖V領域バージョン "d3" のアミノ

酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 8 4:ヒト型化H鎖V領域バージョン "d 3" のアミノ

酸配列

配列番号: 85: FRシャッフリングベクターLv1S

配列番号: 86: FRシャッフリングベクターh5 L v 4 S

配列番号:87:FRシャッフリングベクターh5Lv2A

配列番号: 88: FRシャッフリングベクターh 5 L v 3 A

配列番号: 89: FRシャッフリングプライマーh5Lv5A

配列番号: 90:プライマーh 5 L v S

配列番号: 9 1 : プライマー h 5 L v A

配列番号: 9 2 : ヒト型化L鎖V領域バージョン "a" のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 93:ヒト型化L鎖V領域バージョン "a" のアミノ酸配列

配列番号:94:FRシャッフリングプライマーF3SS

配列番号:95:FRシャッフリングプライマーF3SA

配列番号:96:FRシャッフリングプライマーF3RS

配列番号:97:FRシャッフリングプライマーF3RA

配列番号:98:ヒト型化L鎖V領域バージョン"b"のアミノ酸

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 99:ヒト型化L鎖V領域バージョン "b" のアミノ酸

配列

配列番号: 100:ヒト型化L鎖V領域バージョン "c" のアミノ

酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:101:ヒト型化L鎖V領域バージョン"c"のアミノ

酸配列

配列番号:102:FRシャッフリングプライマーF2SS

配列番号:103:FRシャッフリングプライマーF2SA

配列番号:104:FRシャッフリングプライマーF2XS

配列番号:105:FRシャッフリングプライマーF2XA

配列番号: 106:ヒト型化L鎖V領域バージョン "b1" のアミ

ノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号: 1·0 7: ヒト型化L鎖V領域バージョン"b 1"のアミ

ノ酸配列

配列番号:108:ヒト型化L鎖V領域バージョン"b2"のアミ

ノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号:109:ヒト型化L鎖V領域バージョン"b2"のアミ

ノ酸配列

配列番号:110:ヒト型化H鎖V領域全バージョンのFR1のア

ミノ酸配列

配列番号: I I I : ヒト型化H鎖V領域バージョン "a" ~ "j"

のFR2のアミノ酸配列

配列番号:112:ヒト型化H鎖V領域バージョン"b1"及び"

d 1 " の R F 2 の ア ミ ノ 酸 配 列

配列番号: 1 1 3 : ヒト型化H鎖V領域バージョン"b 3"及び"

d 3 " の R F 2 の ア ミ ノ 酸 配 列

配列番号:114:ヒト型化H鎖V領域バージョン "a"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号: 1 1 5: ヒト型化H鎖V領域バージョン "b", "b 1

"及び"b3"のFR3のアミノ酸配列

配列番号:116:ヒト型化H鎖V領域バージョン"c"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号: 1 1 7: ヒト型化H鎖V領域バージョン "d", "d 1

"及び"d3"のFR3のアミノ酸配列

配列番号:118:ヒト型化H鎖V領域バージョン"e"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号:119:ヒト型化H鎖V領域バージョン"f"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号:120:ヒト型化H鎖V領域バージョン "g"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号:121:ヒト型化H鎖V領域バージョン"h"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号:122:ヒト型化H鎖V領域バージョン"i"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号:123:ヒト型化H鎖V領域バージョン"j"のFR3

のアミノ酸配列

配列番号: 1 2 4: ヒト型化H鎖V領域全バージョンのFR4のアミノ酸配列

- 配列番号:125:ヒト型化L鎖V領域全バージョンのFR1のアミノ酸配列
- 配列番号: 1 2 6: ヒト型化L鎖 V 領域バージョン "a", "b" 及び "c"の FR 2 の アミノ酸配列
- 配列番号: 1 2 7: ヒト型化L鎖V領域バージョン "b 1" のFR 2 のアミノ酸配列
- 配列番号: 1 2 8: ヒト型化L鎖V領域バージョン "b 2" のFR 2 のアミノ酸配列
- 配列番号: 1 2 9 : ヒト型化L鎖V領域バージョン "a"のFR 3 のアミノ酸配列
- 配列番号: 131: ヒト型化L鎖V領域バージョン "c"のFR3 のアミノ酸配列
- 配列番号: 1 3 2 : ヒト型化L鎖V領域全バージョンFR 4 のアミノ酸配列
- 配列番号:133:ヒト型化H鎖V領域全バージョンCDR1のアミノ酸配列
- 配列番号:134:ヒト型化H鎖V領域全バージョンのCDR2のアミノ酸配列
- 配列番号:135:ヒト型化H鎖V領域全バージョンのCDR3のアミノ酸配列
- 配列番号: 1 3 6 : ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR1の アミノ酸配列
- 配列番号:137:ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR2の

アミノ酸配列

配列番号: 1 3 8: ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR3のアミノ酸配列

配列番号: 1 3 9 : 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 0 : 抗一TFマウスモノクローナル抗体ATR-3
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 1: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4 のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 2 : 抗一TFマウスモノクローナル抗体ATR-5
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 3 : 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7 の H鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 4: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8 のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 5 : 抗一TFマウスモノクローナル抗体ATR-2
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 6: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3 のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 7: 抗一TFマウスモノクローナル抗体ATR- 4 の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 8: 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5 のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 4 9 : 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号: 1 5 0 : 抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8 のL鎖V領域のアミノ酸配列 配列番号:151:可溶型ヒトTFのアミノ酸配列及びそれをコー

ドする塩基配列

配列番号:152:可溶型ヒトTFのアミノ酸配列

請求の範囲

- 1. ヒト組織因子(TF)に対するマウスモノクローナル抗体の ヘビー(H)鎖可変(V)領域と、ヒト抗体H鎖不変(C)領域と を含んで成るキメラH鎖であって、前記H鎖V領域が、
 - (1) 配列番号: 139のアミノ酸配列 (ATR-2)、
 - (2)配列番号:140のアミノ酸配列(ATR-3)、
 - (3)配列番号:141のアミノ酸配列(ATR-4)、
 - (4) 配列番号: 1 4 2 のアミノ酸配列 (ATR-5)、
 - (5) 配列番号: 1 4 3 のアミノ酸配列 (ATR-7)、
- (6) 配列番号: 1 4 4 のアミノ酸配列 (ATR-8)、 のいずれかのアミノ酸配列を有する、キメラH鎖。
- 2. 前記 H 鎖 V 領域が、配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列を有する 、請求項 1 に記載のキメラ H 鎖。
- 3. 前記 H 鎖 C 領域が、 C γ 1, C γ 2, C γ 3 又 は C γ 4 領域である請求項 1 又 は 2 に記載の キメラ H 鎖。
- 4. 前記 H鎖 V 領域が配列番号: 1 4 2 のアミノ酸配列を有し、 そして前記 H鎖 C 領域が C γ 4 である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項 に記載のキメラ H鎖。
- 5. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のライト (L) 鎖 V 領域と、ヒト抗体 L 鎖 C 領域とを含んで成るキメラ L 鎖であっ て、前記 L 鎖 V 領域が、
 - (1)配列番号:145のアミノ酸配列(ATR-2)、
 - (2)配列番号:146のアミノ酸配列(ATR-3)、
 - (3) 配列番号: 1 4 7 のアミノ酸配列 (ATR-4)、
 - (4)配列番号:148のアミノ酸配列(ATR-5)、
 - (5) 配列番号: 1 4 9 のアミノ酸配列 (ATR-7)、

(6)配列番号:150のアミノ酸配列(ATR-8)、 のいずれかのアミノ酸配列を有する、キメラL鎖。

- 6. 前記L鎖V領域が配列番号:148のアミノ酸配列を有する 、請求項5に記載のキメラL鎖。
- 前記L鎖C領域がCλ又はCκ領域である、請求項5又は6
 に記載のキメラL鎖。
- 8. 前記L鎖V領域が配列番号:148のアミノ酸配列を有し、そして前記L鎖C領域が $C\kappa$ である記載項 $5\sim7$ のいずれか1項に記載のキメラL鎖。
- 9. 請求項1~4のいずれか1項に記載のキメラH鎖及び請求項5~8のいずれか1項に記載のキメラL鎖を含んで成る、ヒトTFに対するキメラ抗体。
- 10.請求項4に記載のキメラH鎖及び請求項8に記載のキメラ L鎖を含んで成る、ヒトTFに対するキメラ抗体。
- 11. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域相補性決定領域(CDR)及びヒト抗体H鎖V領域フレームワーク領域(FR)を含んで成るヒト型化H鎖V領域において、前記CDRが、次のアミノ酸配列:

H-CDR1: Asp Tyr Tyr Met His (配列番号: 1 3 3)

H-CDR2: Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly (配列番号: 134)

H-CDR3: Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (配列番号: 135)

を有する、ヒト型化H鎖V領域。

1 2. 前記 F R が次のアミノ酸配列:

H - F R 1 : Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu
Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys

Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (配列番号: 1 10)

- $H F R 2 : 次の配列(1) \sim (3)$ のいずれか:
- (1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (配列番号:111)
- (2) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly (配列番号: 1 1 2)
- (3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (配列番号:113)
 - H-FR3:次の配列(1)~(10)のいずれか:
 - (1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号: 1 1 4)
 - (2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号: 1 1 5)
 - (3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号:116)
 - (4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号:117)
 - (5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号: 1 1 8)
 - (6) Arg Val Thr lie Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号: 119)

(7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala
Val Tyr Ser Cys Ala Arg (配列番号: 1 2 0)

- (8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala
 Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
 lle Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号: 1 2 1)
- (9) Arg Val Thr lle Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
 Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号: 1 2 2)
- (10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号: 123
- FR4: Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser (配列番号: 124)

を有する、ヒト型化H鎖V領域。

- 13. 配列番号:30 (バージョンa)、配列番号:40 (バージョンb)、配列番号:42 (バージョンc)、配列番号:50 (バージョンd)、配列番号:52 (バージョンe)、配列番号:58 (バージョンf)、配列番号:60 (バージョンg)、配列番号:64 (バージョンh)、配列番号:70 (バージョンi)、配列番号:72 (バージョンj)、配列番号:76 (バージョンb1)、配列番号:78 (バージョンd1)、配列番号:82 (バージョンd1)、配列番号:78 (バージョンd1)、配列番号:82 (バージョンd3) に示すアミノ酸配列を有する、請求項11又は12に記載のヒト型化H鎖V領域。
 - 14. 配列番号: 40 (バージョンb) のアミノ酸配列を有する

請求項11~13のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V領域。

- 15. 配列番号:70 (バージョンi)のアミノ酸配列を有する、請求項11~13のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V領域。
- 16. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域 CDR及びヒトL鎖V領域FRを含んで成るヒト型化L鎖V領域に おいて、前記CDRが、次のアミノ酸配列:
- L-CDR1: Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser (配列番号: 136)
- L-CDR2: Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (配列番号: 137)
- L-CDR3: Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (配列番号: 138)を有する、ヒト型化L鎖V領域。
 - 17. 前記FRが次のアミノ酸配列:
 - L-FR1: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys (配列番号: 1 2 5)
 - L-FR2:次の配列(1)~(3)のいずれか:
- (1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu lle Tyr (配列番号: 1 2 6)
- (2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr (配列番号: 1 2 7)
- (3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr (配列番号: 1 2 8)
 - L-FR3:次の配列(1)~(3)のいずれか:
 - (1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号: 129)

(2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Tyr Thr Leu Thr lle Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号: 1 3 0)

- (3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号: 1 3 1)
- L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (配列番号: 132)

を有する、請求項16に記載のヒト型化L鎖V領域。

- 18. 配列番号:93 (バージョンa)、配列番号:99 (バージョンb)、配列番号:101 (バージョンc)、配列番号:10 7 (バージョンb1) 又は配列番号:109 (バージョンb2) に示すアミノ酸配列を有する、請求項16又は17に記載のヒト型化L鎖V領域。
- 19. 配列番号:99 (バージョンb)のアミノ酸配列を有する 、請求項16~18のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V領域。
- 20. 配列番号:109 (バージョンb2) に示すアミノ酸配列を有する、請求項16~18のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖 V領域。
- 21. 請求項11~15のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V 領域及びヒト抗体H鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化H鎖。
- 22.請求項14に記載のヒト型化H鎖V領域(バージョンb)及びヒト抗体H鎖C領域を含んで成るヒトTFに対する抗体のヒト型化H鎖。
- 23. 請求項15に記載のヒト型化H鎖V領域(バージョンi) 及びヒト抗体のH鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体の

ヒト型化H鎖。

24. 前記ヒト抗体のH鎖C領域が、C γ 1, C γ 2, C γ 3又はC γ 4である、請求項 $21\sim23$ のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖。

- 25.請求項16~20のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V 領域及びヒト抗体L鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。
- 26.請求項19に記載のヒト型化L鎖V領域(バージョンb)及びヒト抗体のL鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。
- 27. 請求項20に記載のヒト型化L鎖V領域(バージョンb2)及びヒト抗体のL鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。
- 2 8. 前記ヒト抗体のL鎖C領域が、Cλ又はCκである、請求項25~27のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖。
- 29.請求項21~24のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖及び請求項25~28のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。
- 30.請求項22に記載のヒト型化H鎖(バージョンb)及び請求項26に記載のヒト型化L鎖(バージョンb)を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。
- 3 1. 請求項 2 3 に記載のヒト型化 H 鎖 (バージョン i) 及び請求項 2 6 に記載のヒト型化 L 鎖 (バージョン b) を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。
- 32.請求項23に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)及び請求項27に記載のヒト型化L鎖(バージョンb2)を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

3 3. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のキメラ H 鎖をコード する D N A。

- 3 4. 請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のキメラ H 鎖をコード する D N A。
- 3 5. 請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のキメラ L 鎖をコード する D N A 。
- 3 6. 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のキメラ L 鎖をコード する D N A 。
- 37. 請求項11~15のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V 領域をコードするDNA。
- 3 8. 請求項 1 4 に記載のヒト型化H鎖V領域(バージョンb)をコードするDNA。
- 3 9. 請求項 1 5 に記載のヒト型化 H 鎖 V 領域 (バージョン i) をコードする D N A 。
- 4 0. 請求項 1 6 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のヒト型化 L鎖 V 領域をコードする D N A。
- 41. 請求項19に記載のヒト型化L鎖V領域(バージョンb)をコードするDNA。
- 4 2. 請求項 2 0 に記載のヒト型化L鎖 V 領域 (バージョン b 2) をコードする D N A 。
- 43. 請求項21~24のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖を コードするDNA。
- 4 4 . 請求項 2 2 又は 2 4 に記載のヒト型化 H 鎖 (バージョン b) をコードする D N A 。
- 4 5 . 請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト型化 H 鎖 (バージョン i) をコードする D N A 。
 - 4 6. 請求項25~28のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖を

コードするDNA。

47. 請求項26又は28に記載のヒト型化L鎖 (バージョンb) をコードするDNA。

- 4 8. 請求項 2 7 又は 2 8 に記載のヒト型化 L 鎖 (バージョン b 2) をコードする D N A。
- 49. 請求項33に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 50. 請求項34に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 51. 請求項35に記載のキメラL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 52.請求項36に記載のキメラL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 53. 請求項33に記載のキメラH鎖をコードするDNAと請求項35に記載のキメラL鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 5 4. 請求項 3 4 に記載のキメラH鎖をコードするDNAと請求項 3 6 に記載のキメラL鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 5 5 . 請求項 4 3 に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 5 6. 請求項 4 4 に記載のヒト型化 H 鎖 (バージョン b) をコードする D N A を含んで成る発現ベクター。
- 57. 請求項45に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 58.請求項46に記載のヒト型化L鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

59. 請求項 4 7 に記載のヒト型化L鎖 (バージョンb) をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

- 60. 請求項48に記載のヒト型化L鎖 (バージョンb2) をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。
- 61. 請求項43に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAと請求項46に記載のヒト型化L鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 62. 請求項44に記載のヒト型化H鎖(バージョンb)をコードするDNAと請求項47に記載のヒト型化L鎖(バージョンh)をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 63. 請求項45に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)と請求項47に記載のヒト型化L鎖(バージョンb)をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 64. 請求項45に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)をコードするDNAと請求項48に記載のヒト型化L鎖(バージョンb2)をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。
- 6 5. 請求項 4 9 に記載のキメラH鎖をコードする DNAを含んで成る発現ベクターと、請求項 5 1 に記載のキメラL鎖をコードする DNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。
- 66. 請求項50に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項52に記載のキメラL鎖をコードする発現ベクターとにより形質転換された宿主。
- 67. 請求項53に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
- 68. 請求項54に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
 - 69. 請求項55に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAを含

んで成る発現ベクターと、請求項58に記載のヒト型化上鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

- 70.請求項56に記載のヒト型化H鎖(バージョンb)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項59に記載のヒト型化L鎖(バージョンb)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。
- 71. 請求項57に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項59に記載のヒト型化L鎖(バージョンb)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。
- 72.請求項57に記載のヒト型化H鎖(バージョンi)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項6に記載のヒト型化L鎖(バージョンb2)をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。
- 73. 請求項61に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
- 74.請求項62に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
- 75. 請求項63に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
- 76. 請求項64に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
- 77. 請求項65に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。
 - 78. 請求項66に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗

体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。

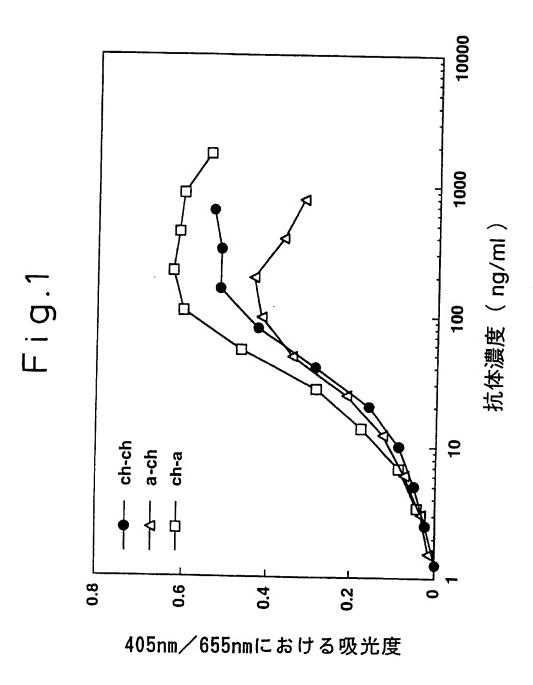
- 79. 請求項67に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。
- 80. 請求項68に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。
- 81.請求項69に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。
- 82.請求項70に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化 抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体 の製造方法。
- 83.請求項71に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。
- 84.請求項72に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。
- 85.請求項73に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化 抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体 の製造方法。
- 86.請求項74に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。
 - 87. 請求項75に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化

抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

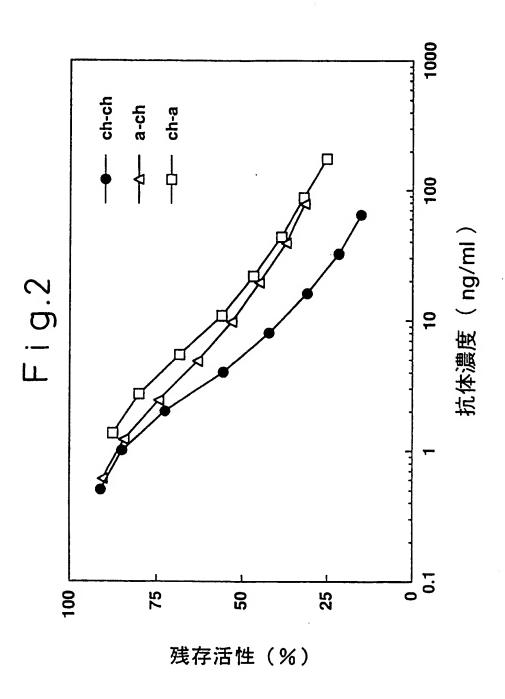
- 88.請求項76に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。
- 89. 非ヒト由来の相補性決定領域(CDR)及び天然ヒト抗体 由来のフレームワーク領域(FR)を有する免疫原性を低減させた 天然ヒト型化抗体の製造方法において、
- (1)目的とする抗原に対して反応性の非ヒトモノクローナル抗体を用意し、
- (2)前記(1)のモノクローナル抗体中のFRのアミノ酸配列に対して高い相同性を有するヒト抗体を複数用意し、
- (3)前記(2)における1種類のヒト抗体の4個のFRを前記(1)の非ヒトモノクローナル抗体の対応するFRにより置換して第一のヒト型化抗体を作製し、
- (4)前記(3)において作製したヒト型化抗体の抗原への結合 性又は抗原の生物活性を中和する能力を測定し、
- (5)前記(3)において作製したヒト型化抗体中の1~3個のFRを、(2)で用意したヒト抗体の内、(3)で使用したものとは異なるヒト抗体の対応するFRにより置換して第二のヒト型化抗体を作製し、
- (6)前記(5)で作製した第二のヒト型化抗体と前記(3)で得た第一のヒト型化抗体とを、抗原に対する結合性、又は抗原の生物活性を中和する能力について比較し、好都合な活性を示すヒト型化抗体を選択し、
- (7) 前記(6) で選択されたヒト型化抗体について、前記(3)~(6) の段階を実施し、そして

(8)前記(1)における非ヒトモノクローナル抗体と同等の活性を有するヒト型化抗体が得られるまで前記(3)~(6)の段階を反復する、

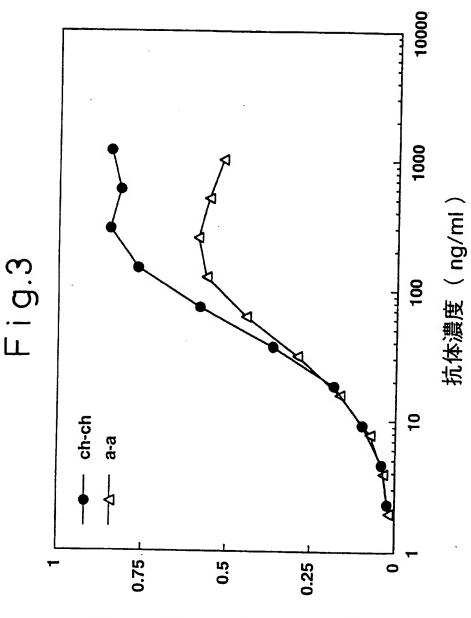
- ことを特徴とする方法。
- 90. 前記目的とする抗原がヒト組織因子 (TF) である、請求項89に記載の方法。
 - 91. 請求項89の方法により得られるヒト型化抗体。
 - 92. 請求項90の方法により得られるヒト型化抗体。
- 93. 請求項29~32及び92のいずれか1項に記載のヒト型 化抗体を含んで成る播種性血管内凝固症候群(DIC)治療剤。



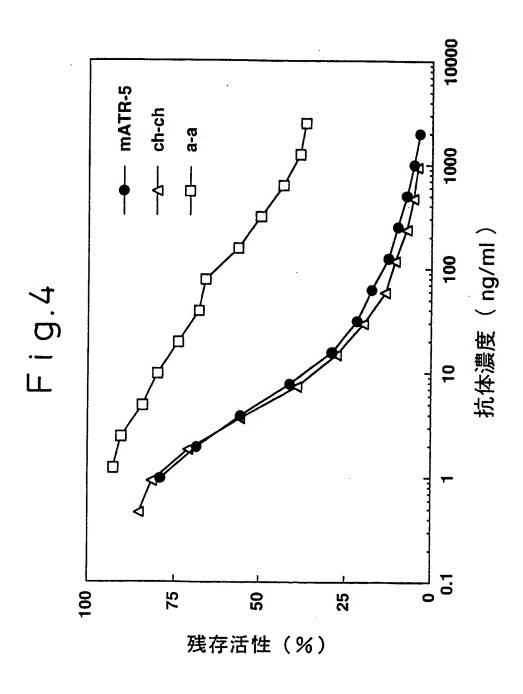
 $\frac{1}{35}$

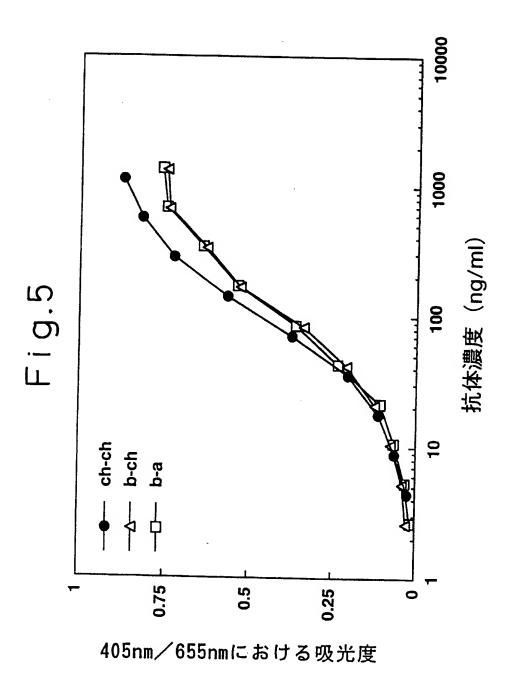


²/35

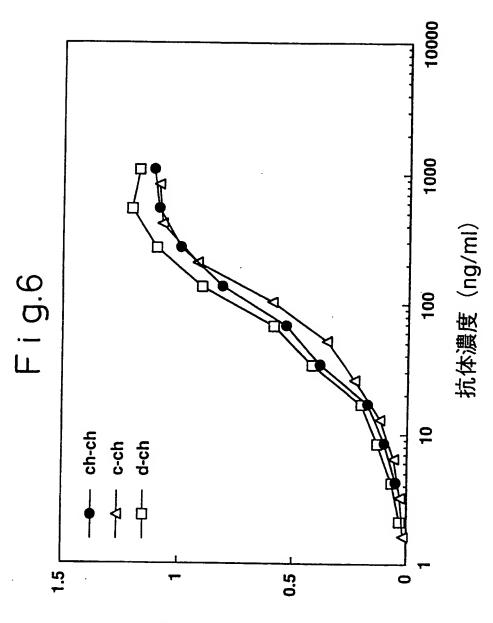


405nm/655nmにおける吸光度

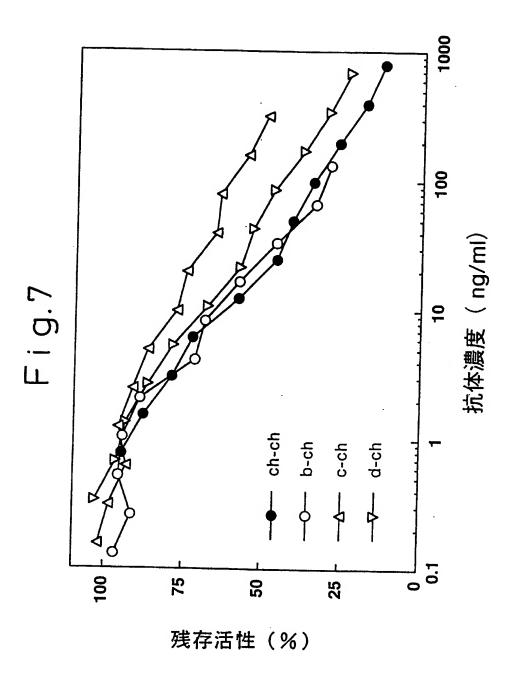


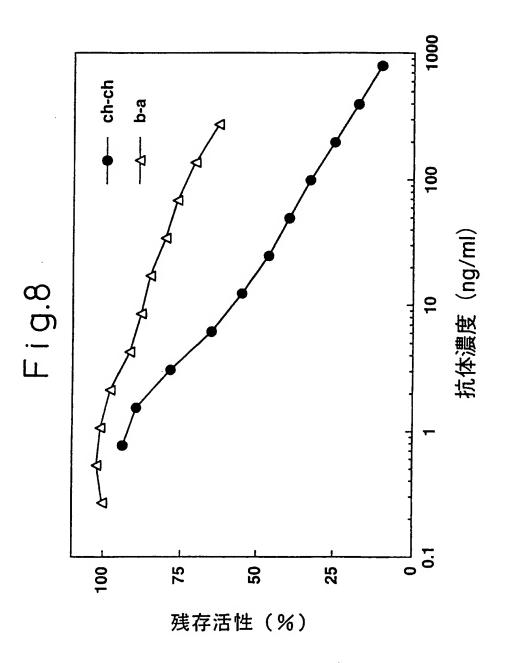


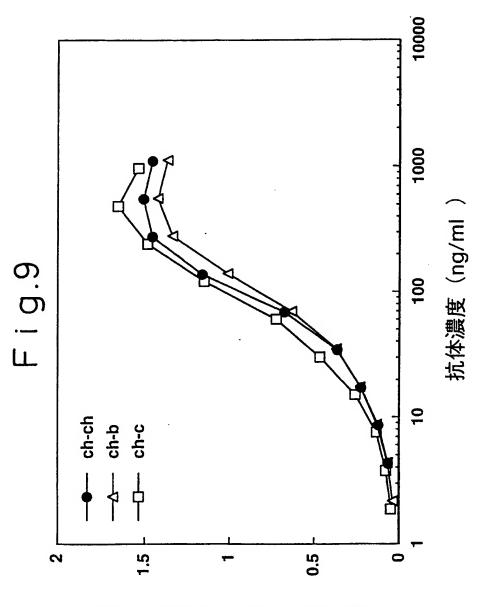
5/35



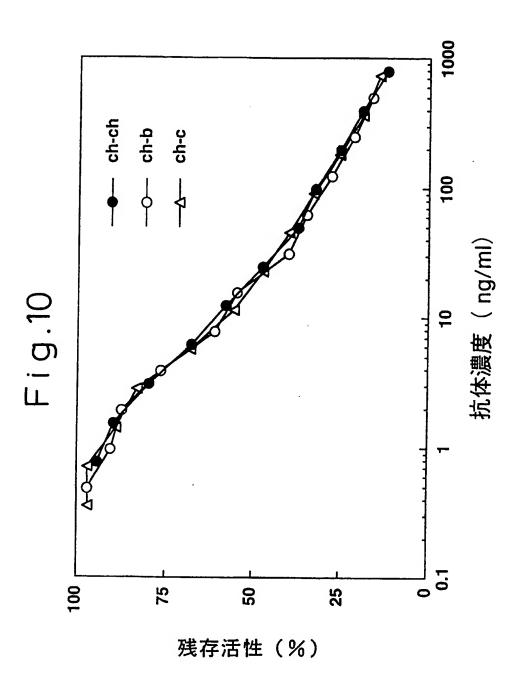
405nm/655nmにおける吸光度

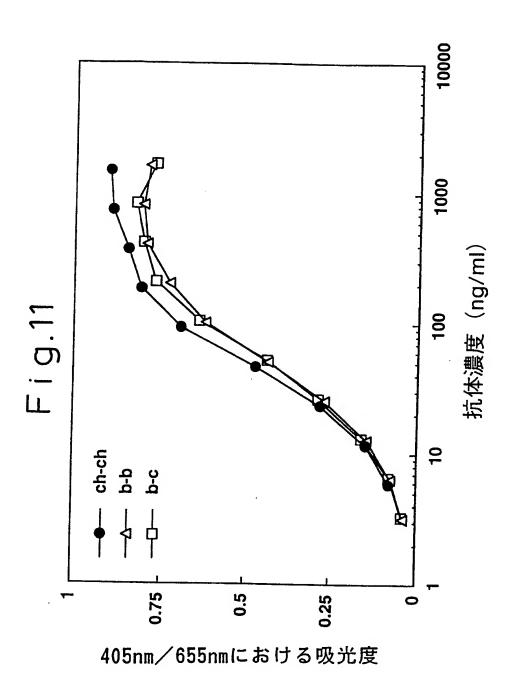




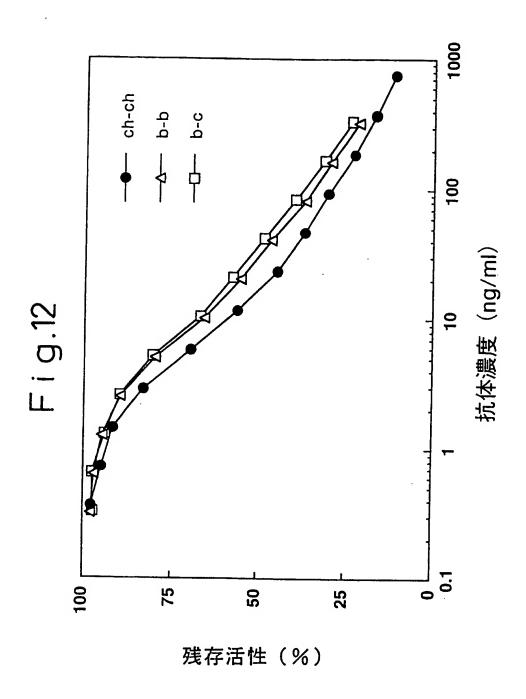


405nm/655nmにおける吸光度

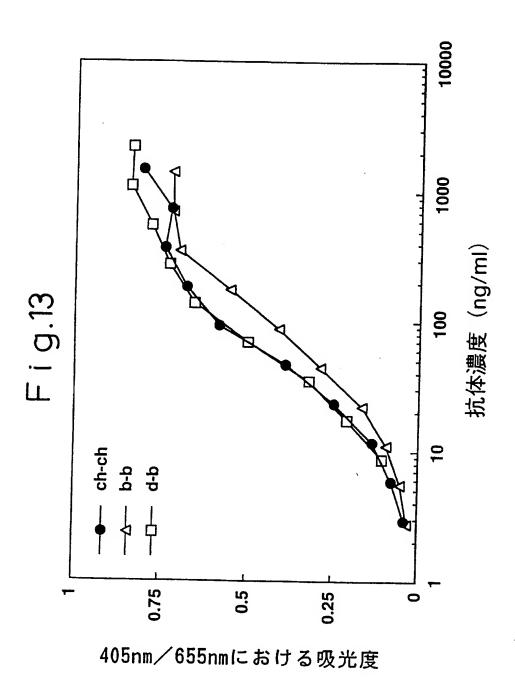




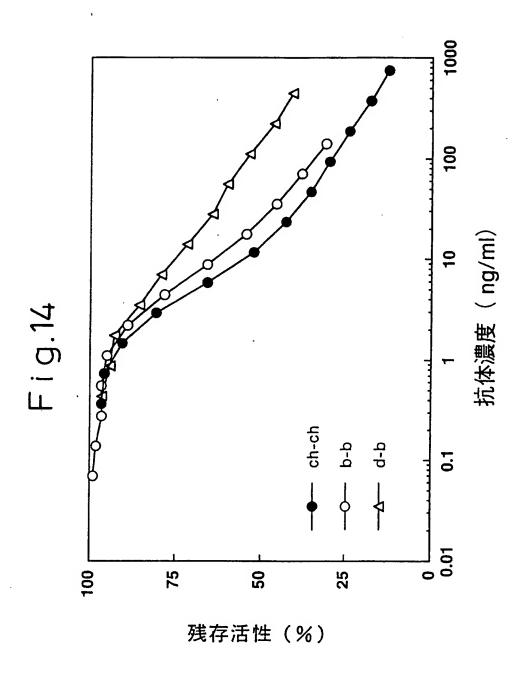
11/35



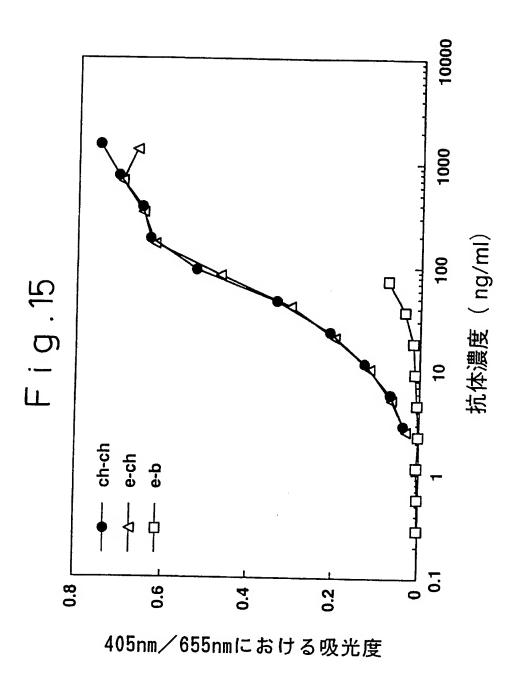
 $\frac{12}{35}$



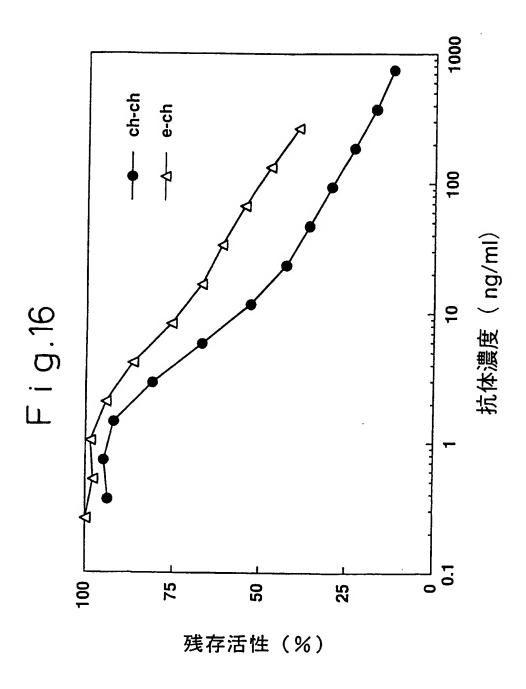
13/35

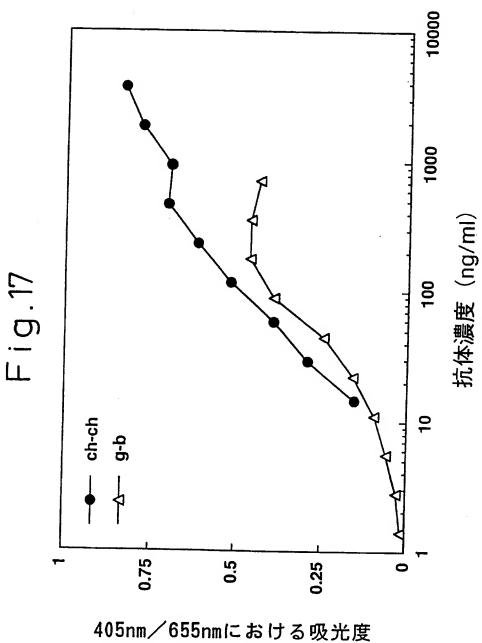


14/₃₅

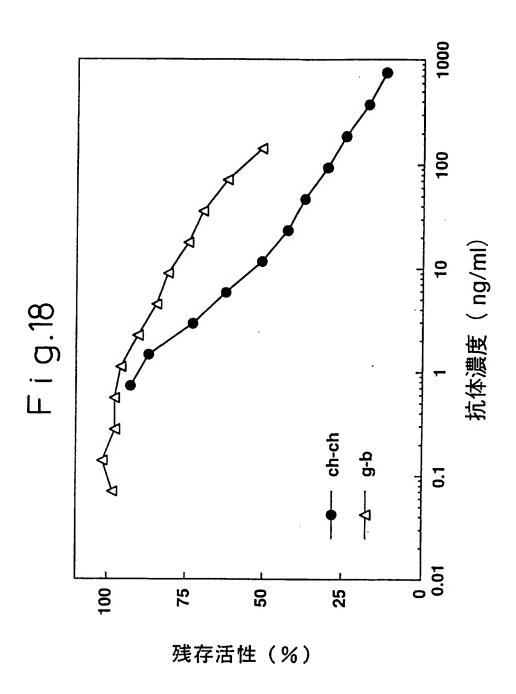


15/35

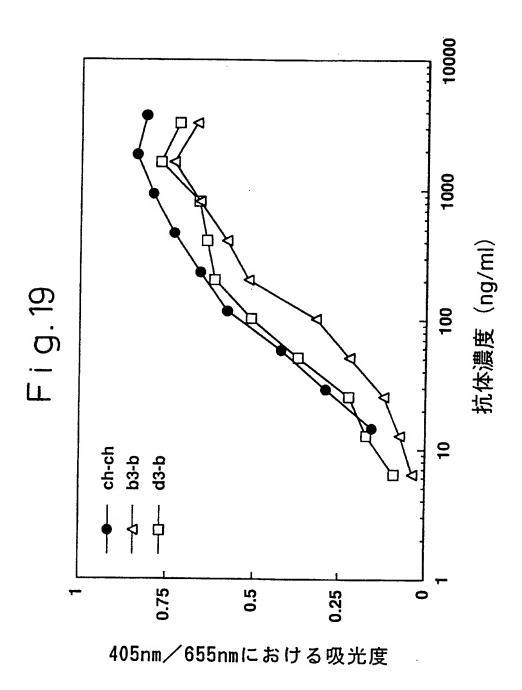




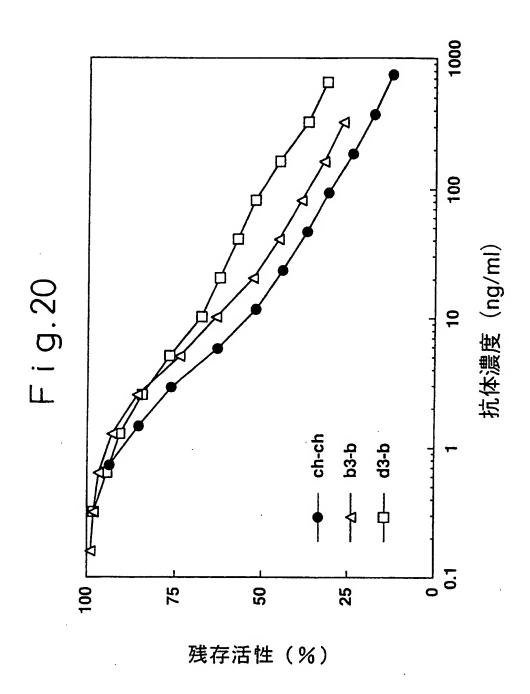
PCT/JP99/01768



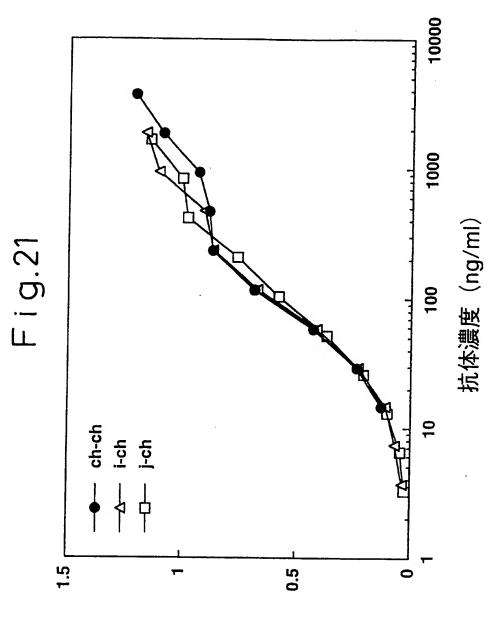
18/₃₅



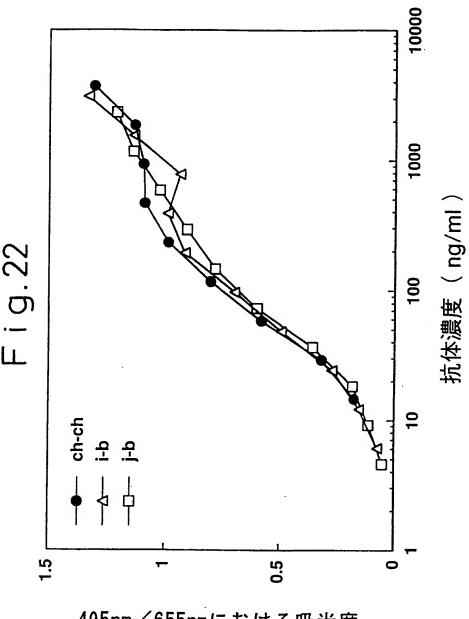
19/35



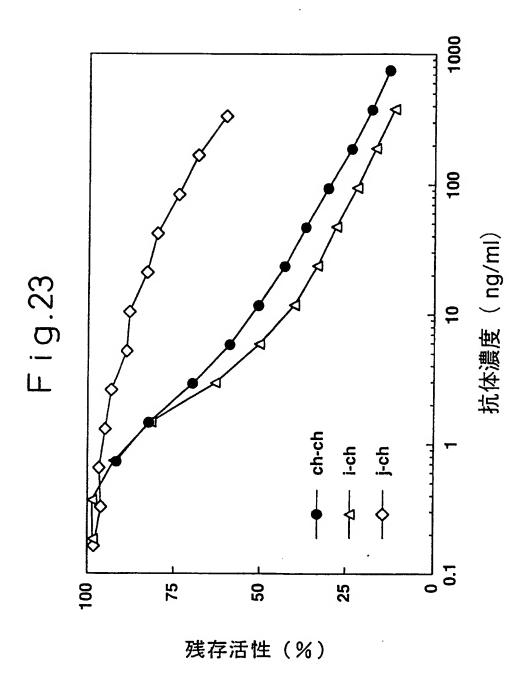
20/35

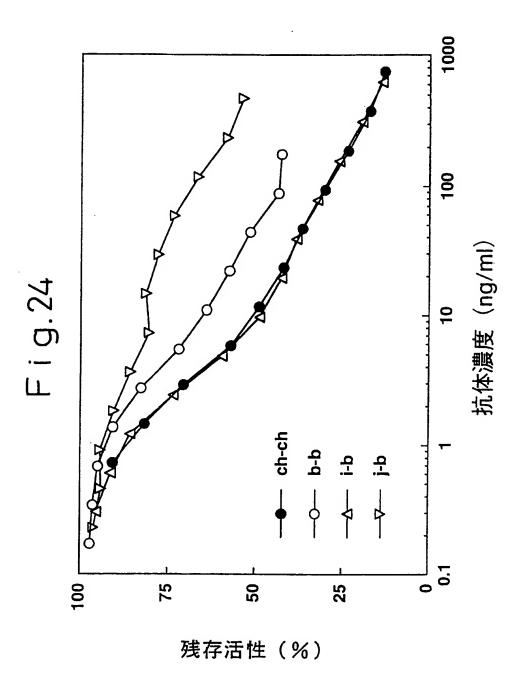


405nm/655nmにおける吸光度

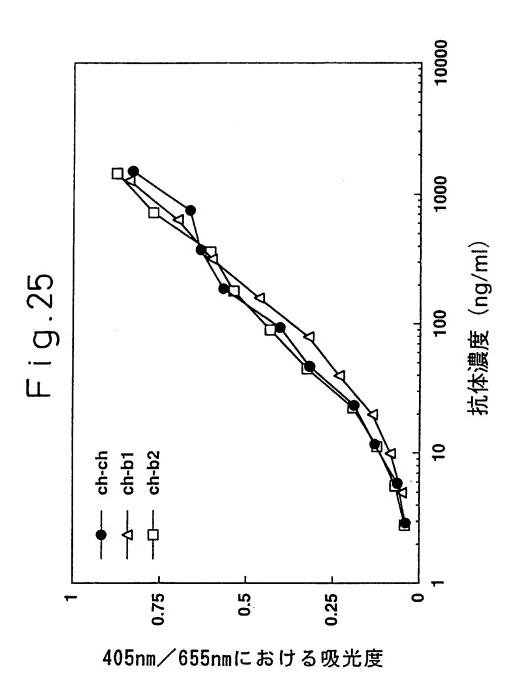


405nm/655nmにおける吸光度

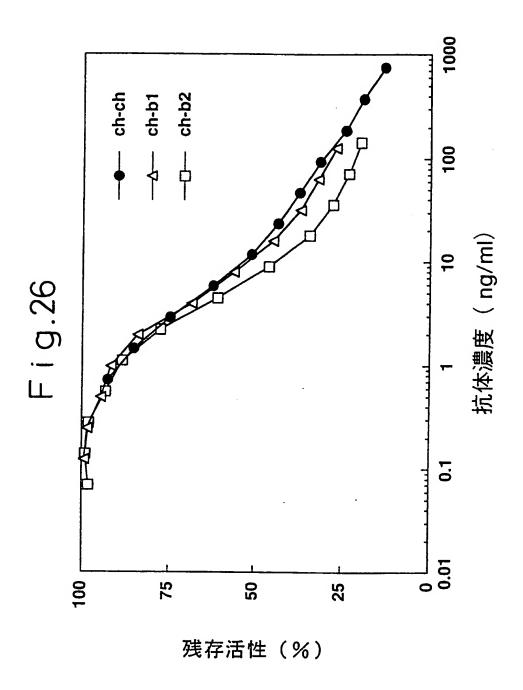


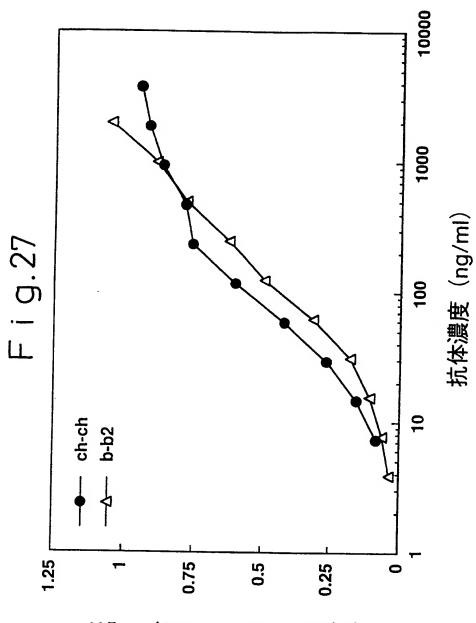


24/35

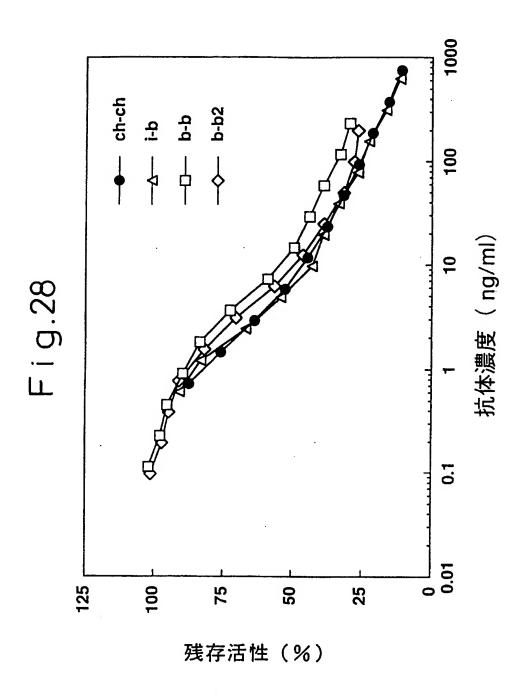


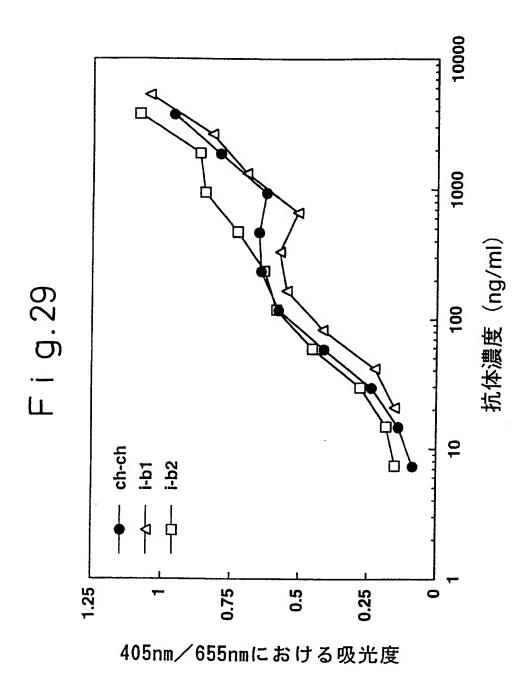
²⁵/35



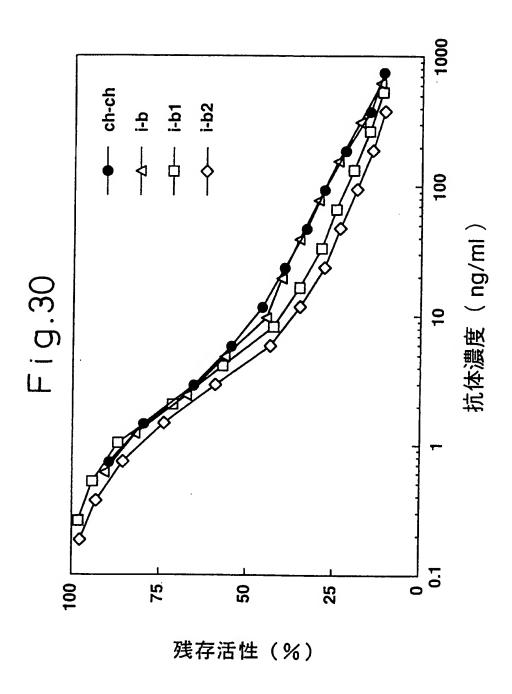


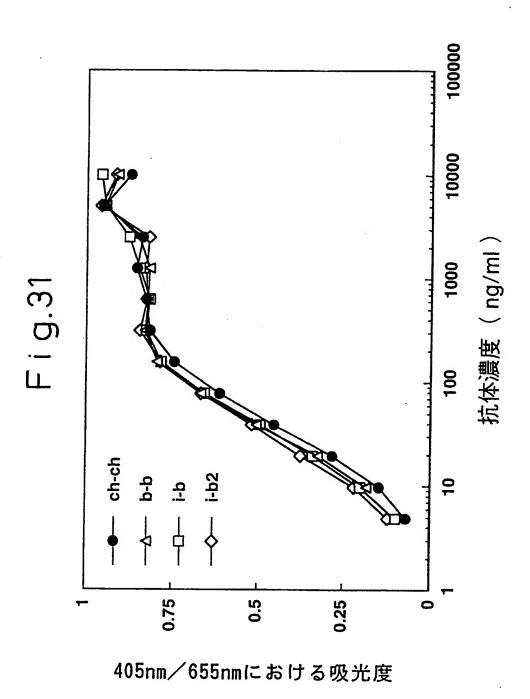
405nm/655nmにおける吸光度



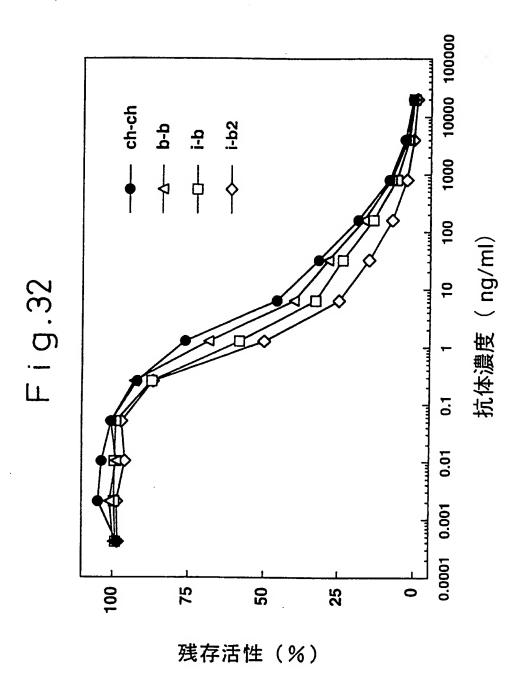


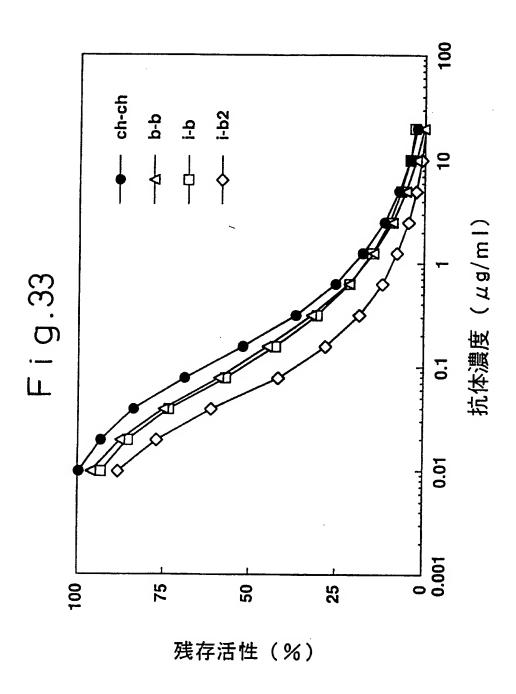
²⁹/₃₅

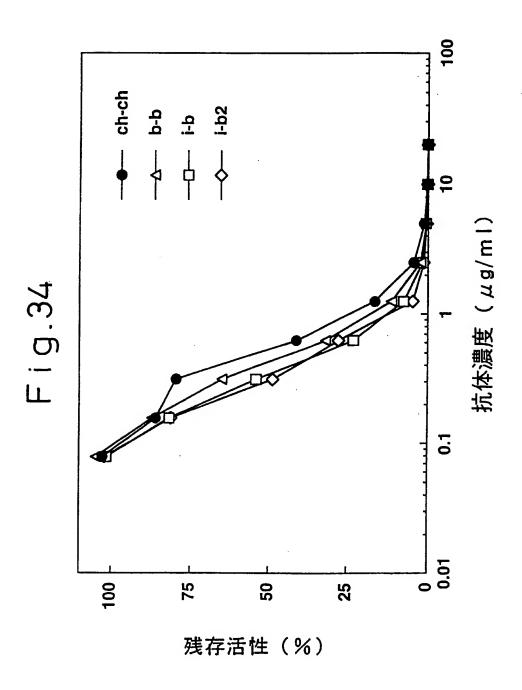




31/35

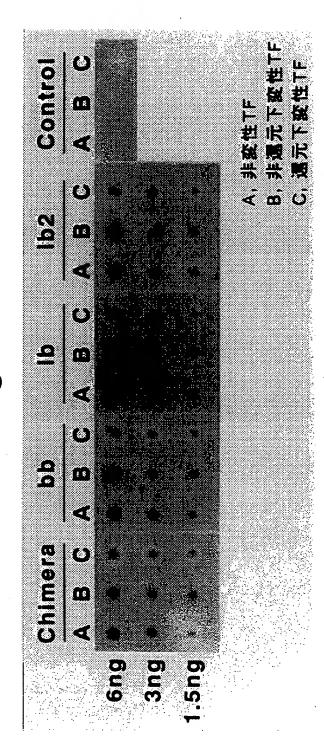






PCT/JP99/01768

Fig. 35



SEQUENCE LISTING

<110>	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA	
<120>	Humanized antibodies against human tissue factor	(TF)
and p	rocess for production of the humanited antibodies	
<130>	G821	
<150>	JP 10-91850	
<151>	1998-04-03	
<160>	152	
<210>	1	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer MHC-G1	
<400>	1	
ggatco	ccggg ccagtggata gacagatg	28
<210>	2	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>	,	
<223>	Primer MHC-G2a	
<400>	2	
ggatcc	cggg agtggataga ccgatgg	27
<210>	3	
(211>	27	
(212)	D N A	

1 / 1 0 9

<213> Artificial Sequence <220> <223> Primer MKC <400> 3 27 ggatcccggg tggatggtgg gaagatg <210> 4 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> M13 Primer M4 <400> 4 gttttcccag tcacgac 17 <210> 5 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> M13 Primer RV <400> 5 17 caggaaacag ctatgac <210> 6 <211> 411 <212> DNA <213> Mouse <220>

WO 99/51743

PCT/JP99/01768

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(441)

-15

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt

Met Glu Trp Ser Trp lle Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

-10

-5

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

15 20 25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192

Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

30 35 40 45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac 240 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn

50 55 60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

65 70 75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336 Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 90 80 85 384 tat tac tgt gca aga ggg gga ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly 105 95 100 caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 411 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser 115 110 <210> 7 <211> 411 <212> DNA <213> Mouse ⟨220⟩ <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(441) <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-3 <400> 7 atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-10

-15

-5 .

gtc	cac	tct	gag	atc	cag	ctg	cag	cag	tct	gga	cct	gag	ctg	gtg	aag	96
Vai	His	Ser	Glu	lle	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	
			1				5					10				
cct	ggg	gct	tca	gtg	aag	gta	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tac	tca	ttc	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
	15					20			•		25					
act	gac	tac	aac	atg	tac	tgg	gtg	aag	cag	agc	cat	gga	aag	agc	ctt	192
Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	
30					35					40					45	
gag	tgg	att	gga	tat	att	gat	cct	tac	aat	ggt	ggt	act	atc	tac	aac	240
Glu	Trp	He	Gly	Tyr	He	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	He	Tyr	Asn	
				50					55					60		
cag	aag	ttc	aag	ggc	aag	gcc	aca	ttg	act	gtt	gac	aag	tcc	tcc	agc	288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
			65					70					75			
aca	gcc	ttc	atg	cat	ctc	aac	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	336
Thr	Ala	Phe	Met	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
		80					85					90				
tat	tac	tgt	gca	aga	gga	ggg	gaa	ggg	tac	tac	ttt	gac	tac	tgg	ggc	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
	95					100					105					
caa	ggc	acc	act	ctc	aca	gtc	tcc	tca								411
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser							,	
110		•		•	115								٠			
<210)> 8															
<211	> 4	80														
<212	2> D	NA														

<213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(408) <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-4 <400> 8 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val IIe Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly -15 -10 -5 gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg 96 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg 1 5 10 cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att 144 Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile 15 20 25 aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu 35 30 40 45 gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac 240

55

60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp

50

288 ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn 65 70 75 336 aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val 80 85 90 tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384 Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 95 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 115 110 <210> 9 <211> 408 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(408) <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 9

atg	aaa	tgc	agc	tgg	gtc	atc	ttc	ttc	ctg	atg	gca	gtg	gtt	aca	ggg	48
Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Val	lle	Phe	Phe	Leu	Met	Ala	Val	Val	Thr	Gly	
				-15					-10					-5		
gtc	aat	tca	gag	gtt	cag	ctg	cag	cag	tct	ggg	act	aac	ctt	gtg	agg	96
Val	Asn	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Thr	Asn	Leu	Val	Arg	
			1				5					10				
cca	ggg	gcc	tta	gtc	aag	ttg	tcc	tgc	aaa	ggt	tct	ggc	ttc	aac	att	144
Pro	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	He	
	15					20					25					
aaa	gac	tac	tat	atg	cac	tgg	gtg	aag	cag	agg	cct	gaa	cag	ggc	ctg	192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	GIn	Arg	Pro	Glu	Gin	Gly	Leu	
30					35					40					45	
gag	tgg	att	gga	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggt	cat	agt	atg	tat	gac	240
Glu	Trp	Ile	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	
				50					55					60		
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	aag	gcc	agt	ata	aca	gca	gac	aca	tcc	tcc	aac	288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Ser	lle	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	
			65					70					75			
aca	gcc	tac	ctg	cag	ctc	agc	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	act	gcc	gtc	336
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
		80					85					90				
tat	ttc	tgt	gct	aga	gac	tcg	ggc	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggt	caa	384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
	95					100					105					
gga	acc	tca	gtc	acc	gtc	tcc	tca									408
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
110					115											

<210> 10 <211> 411 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide ⟨222⟩ (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(411) <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-7 <400> 10 atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48 Met Glu Trp Ser Trp IIe Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly -5 -15 -10 gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96 Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys 1 5 10 cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe 15 20 25 cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192

40

45

Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

35

30

240 gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn 60 50 55 cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288 Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser 70 75 65 336 aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 85 90 80 tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly 95 100 105 411 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 115 110 <210> 11 <211> 411 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(411) <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 11

													•				
atg	gaa	tgg	agc	tgg	atc	ttt	ctc	ttc	ctc	ctg	tca	gga	act	aca	ggt	48	
Met	Glu	Trp	Ser	Trp	lle	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly		
				-15					-10					-5			
gtc	cac	tct	gac	atc	cag	ctg	cag	cag	tct	gga	cct	gag	ctg	gtg	aag	96	
Val	His	Ser	Asp	He	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys		
			1				5					10					
cct	ggg	gct	tca	gtg	aag	gta	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tac	tca	ttc	144	
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe		
	15					20					25						
act	gac	tac	aac	ata	ttc	tgg	gtg	aag	cag	agc	cat	gga	aag	agc	ctt	192	
Thr	Asp	Tyr	Asn	lle	Phe	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu		
30					35					40					45		
	tgg	att	gga	tat		gat	cct	tac	act	ggt	ggt	act	ggc	tac	aac	240	
						Asp											
0.0			0.,	50			•••	-,-	55	<i>u.,</i>	. .,	••••	,	60			
ഭര	220	ttc	ลลต		220	gcc	aca	ttσ		ott	gar	ลลฮ	tcc		agr	288	
						Ala										200	
UIII	D)S	THE		nsp	гуз	nia	1111		1111	141	vsh	ьys		961	361		
			65					70					75				
aca	gcc	ttc	atg	cat	ctc	aac	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	336	
Thr	Ala	Phe	Met	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val		
		80					85					90					
tat	tac	tgt	gca	aga	ggt	ttc	tac	tat	gat	tac	gac	tgt	tac	tgg	ggc	384	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Cys	Tyr	Trp	Gly		
	95					100					105						

411 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca Gin Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 110 115 <210> 12 <211> 375 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide ⟨222⟩ (1)...(54) <220> <221> mat-peptide <222> (55)...(375) <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-2 <400> 12 48

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly

-15 -10 -5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct

Lys Cys Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ala Ser Gin Ser Ala Ser

5 10

1

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144

Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly

15 20 25 30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192 Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val 35 40 45 ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240 Leu lle Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe 60 50 55 288 agt ggt agt gga tot ggc aca aaa tit tot tic aag atc agc agc cta Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu 65 70 75 cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336 Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr 85 90 80 375 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 95 100 105 <210> 13 <211> 375 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(54) <220> <221> mat-peptide <222> (55)...(375) <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-3

<400> 13

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48 Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly -10 -15 -5 aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96 Lys Cys Asp lle Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser 1 5 10 ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144 Leu Gly Glu Ser Val Thr lle Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr lle Gly 15 20 25 30 aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192 Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val 35 40 45 ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240 Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe 50 55 60 agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu 65 70 75 cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336 Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr 80 85 90 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 95 100 105 <210> 14 <211> 387

<212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(66) <220> <221> mat-peptide <222> (67)...(387) <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-4 <400> 14 atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg 48 Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp -20 -15 -10 ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc 96 Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser ·-5 1 5 10 atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt 144 Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser 15 20 25 cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa 192 Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln 30 40 35 tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc 240

55

Ser Pro Lys Thr Leu lle Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val

50

45

288 cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr 70 65 60 336 atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag lle Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln 90 75 80 85 384 cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu IIe 95 100 105 387 aaa Lys <210> 15 (211) 381 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(60) <220> <221> mat-peptide <222> (61)...(381) <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-5 <400> 15 atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48 Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-10

-5

-15

-20

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96 Gly lie Arg Cys Asp lie Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr 10 1 gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144 Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp 15 20 25 att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct. 192 lle Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro 30 35 40 aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240 Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser 60 45 50 55 aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn 75 65 70 336 aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly 80 85 90 381 gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 95 100 105 <210> 16 <211> 393 <212> DNA <213> Mouse <220> <221> sig-peptide

1 7 / 1 0 9

<222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(394) <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-7 <400> 16 48 atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu -10 -5 -15atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt 96 Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val 1 5 10 acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc 144 Thr lle Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu 15 20 25 192 tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro 30 35 40 ggc cag tet eca aag ege etg ate tat ett gtg tet aaa etg gae tet 240 Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu IIe Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

50 gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 70 75

55

60

65

ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

80 85 90

tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Ly's Leu

95 100 105

gaa ata aaa 393

Glu Ile Lys

110

<210> 17

<211> 393

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(393)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of ant i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat

48

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp

-15

-10

-5

atc	aac	ggt	gat	gtt	gta	ctg	acc	cag	act	cca	ctc	act	ttg	tcg	gtt	96
He	Asn	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	
			1				5					10				
acc	att	gga	caa	cca	gcc	tcc	gtc	tct	tgc	aag	t ca	agt	cag	agc	ctc	144
Thr	He	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	
	15					20					25					
tta	gat	agt	gat	gga	aag	aca	tat	ttg	aat	tgg	ttg	tta	cag	agg	cca	192
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	
30					35					40					45	
ggc	cag	tct	cca	aag	cgc	cta	atc	tat	ctg	gtg	tct	aaa	ctg	gac	tct	240
Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Arg	Leu	He	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	
				50					55					60		
gga	gtc	cct	gac	agg	ttc	act	ggc	agt	gga	tca	ggg	aca	gat	ttc	aca	288
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
			65					70					75			
ctg	aaa	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	ttg	gga	gtt	tat	tat	tgt	336
Leu	Lys	lle	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	
		80					85					90				
tgg	caa	gat	aca	cat	ttt	ccg	gac	acg	ttc	gga	ggg	ggg	acc	aag	ctg	384
Trp	Gln	Asp	Thr	His	Phe	Pro	Asp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	
	95					100					105				•	
gaa	ata	aaa														393
Glu	He	Lys														
110																
<210)> 1	8														
<211	· 3	5														
(212	2> D	NA														

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer ch5HS	
<400> 18	
gtctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcat	35
<210> 19	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Primer ch5HA	
<400> 19	
tgttgctagc tgaggagacg gtgactga	28
⟨210⟩ 20	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Primer ch5LS	
<400> 20	
gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt	35
<210> 21	
⟨211⟩ 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Primer ch5LA	

<400> 21 tgttcgtacg ttttatttcc agcttggt 28 <210> 22 <211> 104 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CDR grafting primer hR5Hv1S <400> 22 ttctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcatcttct tcctgatggc agtggttaca 60 104 ggggttaact cacaggtgca gctgttggag tctggagctg tgct <210> 23 <211> 108 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CDR grafting primer hR5Hv28 <400> 23 acaggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60 108 ctcctgcaag gcttccggat tcaacattaa agactactat atgcattg <210> 24 <211> 108 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 24

```
gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac
                                                           60
                                                           108
atccgccagt attgcctact tggagttctc gagcctgaca aatgagga
<210> 25
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDR grafting primer hR5Hv3A
<400> 25
tcatacatac tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60
ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga
                                                           110
<210> 26
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDR grafting primer hR5Hv5A
<400> 26
agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60
ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc
                                                           110
<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer hR5HvPrS
<400> 27
```

ttctgtcgac ccaccatga 19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 28

agaagctagc tgaggagac

19

<210> 29

<211> 415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanize

d H chain V region

<400> 29

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt	aac	tca	cag	gtg	cag	ctg	ttg	gag	tct	gga	gct	gtg	ctg	gca	agg	96
Val	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	
			1				5					10				
cct	ggg	act	tcc	gtg	aag	atc	tcc	tgc	aag	gct	tcc	gga	ttc	aac	att	144
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	lle	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	lle	
	15					20					25					
aaa	gac	tac	tat	atg	cat	tgg	gta	aaa	cag	agg	cct	gga	cag	ggt	cta	192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
30					35					40					45	
gaa	tgg	att	ggt	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggc	cat	agt	atg	tat	gac	240
Glu	Trp	lle	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	
				50					55					60		
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	agg	gcc	aaa	ctg	act	gca	gcc	aca	tcc	gcc	agt	288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Ala	Ser	
			65					70					75			
att	gcc	tac	ttg	gag	ttc	tcg	agc	ctg	aca	aat	gag	gat	tct	gcg	gtc	336
He	Ala	Tyr	Leu	Glu	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
		80					85					90				
tat	tac	tgt	gça	aga	gac	tcg	ggc	tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
	95					100					105					
ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc							415
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser							
110					115											
<210)> 3	0														
<21	1> 1	19														
<212	2> F	RT														

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chai

n V region

<400> 30

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

5 10

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp lle

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gin Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser lle Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS

<400>	31		1		
ttcttg	gcca tagtatgtat gacccgaaat	tccagggccg	agtcacaatc	actgcagaca	60
catcca	cgaa cacagcctac atggagctct	cgagtctgag			100
<210>	32				
<211>	75				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR Shuffling primer F	3RFBS			
<400>	32				
ggagct	ctcg agtctgagat ctgaggacac	agccatttat	tactgtgcaa	gagactcggg	60
ctatgo	catg gttct				75
<210>	33				
<211>	100				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR Shuffling primer F	3RFFA			
<400>	33				
ctcaga	ctcg agagctccat gtaggctgtg	ttcgtggatg	tgtctgcagt	gattgtgact	60
cggccc	tgga atttcgggtc atacatacta	tggccaagaa			100
<210>	34				
<211>	75				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR Shuffling primer F	3RFBA			

<400> 34	
agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc	60
agactcgaga gctcc	75
<210> 35	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> FR Shuffling primer F3NMFS	
<400> 35	
ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca	60
catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac	100
<210> 36	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> FR Shuffling primer F3NMBS	
<400> 36	
gaggeteteg agtgtgacag eegeggacae ageegtatat taetgtgeaa gagaeteggg	60
ctatgccatg gttct	75
<210> 37	
<211> 100.	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> FR Shuffling primer F3NMFA	

<400> 37 gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60 100 cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa <210> 38 <211> 75 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR Shuffling primer F3NMBA <400> 38 agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cgcggctgtc 60 75 acactcgaga gcctc <210> 39 <211> 414 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(414) <223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanize

d H chain V region

<400> 39

48	ggg	aca	gtt	gtg	gca	atg	ctg	ttc	ttc	atc	gtc	tgg	agc	tgc	aaa	atg
	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Met	Leu	Phe	Phe	lle	Val	Trp	Ser	Cys	Lys	Met
		-5					-10					-15				
96	agg	gca	ctg	gtg	gct	gga	tct	gag	ttg	ctg	cag	gtg	cag	tca	aac	gtt
	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Gln	Val	Gln	Ser	Asn	Val
				. 10					5				1			
144	att	aac	ttc	gga	tcc	gct	aag	tgc	tcc	atc	aag	gtg	tcc	act	ggg	cct
	He	Asn	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Cys	Ser	lle	Lys	Val	Ser	Thr	Gly	Pro
					25					20					15	
.192	cta	ggt	cag	gga	cct	agg	cag	aaa	gta	tgg	cat	atg	tat	tac	gac	aaa
	Leu	Gly	GIn	Gly	Pro	Arg	Gln	Lys	Val	Trp	His	Met	Tyr	Tyr	Asp	Lys
	45					40					35					30
240	gac	tat	atg	agt	cat	ggc	aat	gcg	cct	gat	aat	ggg	ggt	att	tgg	gaa
	Asp	Tyr	Met	Ser	His	Gly	Asn	Ala	Pro	Asp	Asn	Gly	Gly	He	Trp	Glu
		60					55					50				
288	aac	acg	tcc	aca	gac	gca	act	atc	aca	gtc	cga	ggc	cag	ttc	aaa	ccg
	Asn	Thr	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	He	Thr	Val	Arg	Gly	Gln	Phe	Lys	Pro
			75					70					65			
336	att	gcc	aca	gac	gag	tct	aga	ctg	agt	tcg	ctc	gag	atg	tac	gcc	aca
	lle	Ala	Thr	Asp	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Met	Tyr	Ala	Thr
			٠	90					85					80		
384	caa	ggc	tgg	tac	gac	atg	gcc	tat	ggc	tcg	gac	aga	gca	tgt	tac	tat
	Gln	Gly	Trp	Tyr	Asp	Met	Ala	Tyr	Gly	Ser	Asp	Arg	Ala	Cys	Tyr	Tyr
					105					100			,		95	
414							agc	gct	tca	tcc	gtc	acc	gtc	ctg	acc	ggc
							Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Gly
											115					110

<210> 40 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "b" of humanized H chai n V region <400> 40 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 5 10 1 15 Ser Val Lys lle Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 55 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr 70 75 65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 41

<211> 414

<212> DNA

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (58)...(414)
<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanize
d H chain V region
<400> 41
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg
                                                                   48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                                    -10
                                                        -5
                -15
                                                                   96
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
              1
                              5
                                                10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att
                                                                  144
Pro Gly Thr Ser Val Lys lle Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn lle
     15
                         20
                                             25
                                                                  192
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30
                     35
                                         40
                                                            45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac
                                                                  240
Glu Trp lle Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                 50
                                     55
                                                        60
```

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn 65 70 75 cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336 GIn Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 80 85 90 384 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 95 100 105 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 42 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chai n V region <400> 42 Gin Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 5 1 10 15 Ser Val Lys lie Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn lie Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 43

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

⟨220⟩

<223> FR Shuffling primer F3EPS

<400> 43

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60 aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

<210> 44

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPA

<400> 44

agaaccatgg catagecega gtetetegea cagaaatata eggeegagte eteagatete 60

agactcgaga gctcc	75
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer F3PrS	
<400> 45	
ttcttggcca tagtatgtat	20
<210> 46	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Primer F3PrA	
<400> 46 .	
agaaccatgg catagccc	18
<210> 47	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> FR Shuffling primer F3vHS	
<400> 47	
ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg	60
agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag	100
⟨210⟩ 48	

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHA

<400> 48

agaaccatgg catagecega gtetetegea cagaaataaa eggeegtgte eteagatete 60

agactgttga gctcc

75

<210> 49

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanize d H chain V region

<400> 49

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val lle Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct	ggg	act	tcc	gtg	aag	atc	tcc	tgc	aag	gct	tcc	gga	ttc	aac	att		144
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	lle	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	lle		
	15					20					.25						
aaa	gac	tac	tat	atg	cat	tgg	gta	aaa	cag	agg	cct	gga	cag	ggt	cta		192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu		
30					35					40					45		
gaa	tgg	att	ggt	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggc	cat	agt	atg	tat	gac		240
Glu	Trp	lle	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp		
				50					55					60			
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	aga	gtc	acg	att	act	gcg	gac	gaa	tcc	acg	agc		288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	lle	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser		
			65					70					75				
aca	gcc	tac	atg	gag	ctc	tcg	agt	ctg	aga	tct	gag	gac	tcg	gcc	gta		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val		
		80					85					90					
tat	ttc	tgt	gcg	aga	gac	tcg	ggc	tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa		384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
	95					100					105						
ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc								414
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser								
110					115												
(210)> 5	0															
(211	> 1	19															
(212	2> P	RT															
(213	3> A	rti	fici	ial	Seq	uen	ce										
(220)>																
(223	3> A	min	o ac	e i d	sea	uend	ce o	f v	ers	ion	"d"	n f	hur	nani	zed	Н	cha

n

<400> 50

Gin Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys lle Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp lle

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 51

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

⟨222⟩ (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

-15

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanize d H chain V region

<400> 51

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att

144

Pro Gly Thr Ser Val Lys lle Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn lle

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag 288 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser lle Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys

65 70 75

ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt 336

Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 105 95 100 414 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 52 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chai n V region <400> 52 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 5 1 10 15 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 25 20 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Ser lle Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys lle Ala Tyr 70 80 65 75 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

90

95

85

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 110 105 100 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115 <210> 53 <211> 100 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR Shuffling primer F3SSS <400> 53 ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60 catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100 <210> 54 <211> 75 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR Shuffling primer F3SSA <400> 54 agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60 75 aggctcctga gctcc <210> 55 <211> 100 <212> DNA <213> Artificial Sequence

⟨220⟩

```
<223> FR Shuffling primer F3CDS
<400> 55
ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60
                                                            100
aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg
<210> 56
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FR Shuffling primer F3CDA
<400> 56
agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60
                                                             75
aggctcgaga gttgc
<210> 57
<211> 414
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
⟨220⟩
<221> sig-peptide
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-peptide
(222) (58)...(414)
<223 > Nucleotide sequence coding for version "f" of humanize
d H chain V region
```

<400> 57

48	ggg	aca	gtt	gtg	gca	atg	ctg	ttc	ttc	atc	gtc	tgg	agc	tgc	aaa	atg
	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Met	Leu	Phe	Phe	lle	Val	Trp	Ser	Cys	Lys	Met
		-5					-10					-15				
96	agg	gca	ctg	gtg	gct	gga	tct	gag	ttg	ctg	cag	gtg	cag	tca	aac	gtt
	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Gln	Val	Gln	Ser	Asn	Val
				10					5				1	•		
144	att	aac	ttc	gga	tcc	gct	aag	tgc	tcc	atc	aag	gtg	tcc	act	ggg	cct
	lle	Asn	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Cys	Ser	He	Lys	Val	Ser	Thr	Gly	Pro
					25					20					15	
192	cta	ggt	cag	gga	cct	agg	cag	aaa	gta	tgg	cat	atg	tat	tac	gac	aaa
	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Arg	Gln	Lys	Val	Trp	His	Met	Tyr	Tyr	Asp	Lys
•	45					40					35					30
240	gac	tat	atg	agt	cat	ggc	aat	gcg	cct	gat	aat	ggg	ggt	att	tgg	gaa
	Asp	Tyr	Met	Ser	His	Gly	Asn	Ala	Pro	Asp	Asn	Gly	Gly	lle	Trp	Glu
		60					55					50				
288	agc	acg	tcc	aca	gac	gcg	acc	att	acg	gtc	aga	ggc	cag	ttc	aaa	ccg
	Ser	Thr	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	He	Thr	Val	Arg	Gly	Gln	Phe	Lys	Pro
			75					70					65			
336	gtg	gcc	acg	gac	gac	tct	aga	ctg	agc	agg	ctc	gag	atg	tac	gcc	aca
	Val	Ala	Thr	Asp	Asp	Ser	Arg	Leu	Ser	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Ala	Thr
	•			90					85					80		
384	caa	ggc	tgg	tac	gac	atg	gcc	tat	ggc	tcg	gac	aga	gcg	tgt	tac	tat
	Gln	Gly	Trp	Tyr	Asp	Met	Ala	Tyr	Gly	Ser	Asp	Arg	Ala	Cys	Tyr	Tyr
					105					100					95	
414							agc	gct	tca	tcc	gtc	acc	gtc	ctg	acc	ggc
							Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Gly
											115					110

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chai

n V region

<400> 58

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr lle Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 59

<211> 414

<212> DNA

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (58)...(414)
<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanize
d H chain V region
<400> 59
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg
                                                                   48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                -15
                                   -10
                                                        -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg
                                                                   96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
              1
                                                10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att
                                                                  144
Pro Gly Thr Ser Val Lys IIe Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn IIe
                         20
     15
                                            25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta
                                                                  192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30
                     35
                                        40
                                                            45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac
                                                                 240
Glu Trp lle Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                 50
                                    55
                                                        60
```

ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser 65 70 75 336 aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val 80 85 90 tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384 Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 95 100 105 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 60 <211> 119 <212> PRT <213 > Artificial Sequence ⟨220⟩ <223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chai n V region <400> 60 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr l 5 10 15 Ser Val Lys lle Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

30

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 61

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADS

<400> 61

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60 agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

<210> 62

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADA

<400> 62

agaaccatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcggtgtc cgaggcctta 60

```
75
aggctggtcc actgt
<210> 63
<211> 414
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (58)...(414)
<223 > Nucleotide sequence coding for version "h" of humanize
d H chain
<400> 63
                                                                  48
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                                                        -5
                -15
                                   -10
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg
                                                                  96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
              1
                                                10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att
                                                                 144
Pro Gly Thr Ser Val Lys IIe Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn IIe
                         20
     15
                                            25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta
                                                                 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
  30
                     35
                                                            45
                                       . 40
```

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp 50 55 60 ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser 65 70 75 336 gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile 85 90 80 384 tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 95 414 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115 110 <210> 64 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chai n V region <400> 64 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 1 5 10 15 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gin Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 65

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMS

<400> 65

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60 catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

<210> 66

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMA

5 0 / 1 0 9

<400>	66	
agaacc	atgg catagecega gtetetegea cagtaataca eggeegtgte tteagatete	60
aggctg	ctca gttcc	75
<210>	67	
<211>	100	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	FR Shuffling primer F3BMS	
<400>	67	
ttcttgg	gcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca	60
catecg	cgaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag	100
<210>	68	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	FR Shuffling primer F3BMA	
<400>	68	
agaacca	atgg catagecega gtetetegea caataataaa cageegtgte tgeagatetg	60
aggetee	ctca actcc	7 5
<210>	69	
<211>	414	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	sig-peptide	

```
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (58)...(414)
<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanize
d H chain V region
<400> 69
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg
                                                                    48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                                     -10
                                                         -5
                 -15
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg
                                                                    96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
                                                 10
                              5
              1
.cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att
                                                                   144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
                                             25
                          20
      15
                                                                   192
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
                                                             45
                      35
                                          40
  30
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac
                                                                   240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                                                         60
                                      55
                  50
                                                                   288
 ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc
 Pro Lys Phe Gin Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
```

70

65

75

aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg 336 Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 80 85 90 tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 95 100 105 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 70 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "i" of humanized H chai n V region <400> 70 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 1 5 10 15 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 71

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

⟨222⟩ (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanize d H chain V region

<400> 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

5

1

10

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 71

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanize d H chain V region

<400> 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct	ggg	act	tcc	gtg	aag	atc	tcc	tgc	aag	gct	tcc	gga	ttc	aac	att		144
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	lle	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	He		
	15					20					25						
aaa	gac	tac	tat	atg	cat	tgg	gta	aaa	cag	agg	cct	gga	cag	ggt	cta		192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu		
30					35					40					45		
gaa	tgg	att	ggt	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggc	cat	agt	atg	tat	gac		240
Glu	Trp	He	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp		
				50					55					60			
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	aga	gtc	acc	ttt	acc	gcg	gac	aca	tcc	gcg	aac		288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Asn		
			65					70					7 5				
aca	gcc	tac	atg	gag	ttg	agg	agc	ctc	aga	tct	gca	gac	acg	gct	gtt		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Thr	Ala	Val		
		80					85					90					
tat	tat	tgt	gcg	aga	gac	tcg	ggc	tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa		384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
	95					100					105						
ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc								414
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser								
110					115												
<210)> 7	2															
<211	> 1	19															
<212	2> P	RT															
<213	3> A	rti	f i c	ial	Seq	u e n	ce										
<220)>																
<223	3> A	min	o a	cid	seq	uen	ce (of v	ers	ion	" j "	o f	hui	nani	z e d	Н	chai

n V region <400> 72 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 1 5 10 15 Ser Val Lys lie Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn lie Lys Asp Tyr 20 25 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp He 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115 <210> 73 <211> 79 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR shuffling primer F2MPS <400> 73

60

79

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaatga

tcctgcgaat ggccattct

<210> 74

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

<400> 74

agaatggcca ttcgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg 60 gcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 75

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humaniz ed H chain V region

<400> 75

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt	aac	tca	cag	gtg	cag	ctg	ttg	gag	tct	gga	gct	gtg	ctg	gca	agg	96
Val	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	
			1				5					10				
cct	ggg	act	tcc	gtg	aag	atc	tcc	tgc	aag	gct	tcc	gga	ttc	aac	att	144
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	lle	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	G ₁ y	Phe	Asn	He	
	15					20					25					
aaa	gac	tac	tat	atg	cat	tgg	gtg	cgc	cag	gct	cca	gga	cag	ggc	ctg	192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	GIn	Gly	Leu	
30					35					40					45	
gag	tgg	atg	gga	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggc	cat	agt	atg	tat	gac	240
Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	
				50					55					60		
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	cga	gtc	aca	atc	act	gca	gac	aca	tcc	acg	aac	288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	lle	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	
			65					70					75			
aca	gcc	tac	atg	gag	ctc	tcg	agt	ctg	aga	tct	gag	gac	aca	gcc	att	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	He	
		80					85					90				
tat	tac	tgt	gca	aga	gac	tcg	ggc	tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
	95					100					105					
ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc							414
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser							
110					115											
<210	> 7	6														
<211	> 1	19														
<212	:> P	RT														

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "bl" of humanized H cha

<400> 76

Gin Val Gin Leu Leu Giu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 3

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 77

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

1

<223> Nucleotide sequence coding for version "d1" of humaniz ed H chain V region

<400> 77

15

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att

144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

20

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240 Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr lle Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val 90 80 85 384 tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 105 95 100 414 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 78 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H cha in V region <400> 78 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 5 1 10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 85 90 95 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115 <210> 79 <211> 79 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR shuffling primer F2VHS <400> 79 ttctatgcat tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggattg gagggaatga 60 tcctgcgaat ggccatctt 79 <210> 80 <211> 79 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FR shuffling primer F2VHA <400> 80 aagatggcca ttcgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgtc caggggcctg 60 tcgcacccaa tgcatagaa. 79 <210> 81 <211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence <220> <221> sig-peptide <222> (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(414) <223 > Nucleotide sequence coding for version "b3" of humaniz ed H chain V region <400> 81 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val IIe Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly -15 -10 -5 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg 1 10 5 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile 15 20 25 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu 30 35 40 45 gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

55

60

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288 Pro Lys Phe Gin Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn 70 65 75 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala lie 80 85 90 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 95 100 105 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 <210> 82 <211> 119 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H cha in V region <400> 82 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr 1 5 10 15 Ser Val Lys lie Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn lie Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 55 60 50 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala lle Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115 <210> 83 <211> 414 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> sig-peptide ⟨222⟩ (1)...(57) <220> <221> mat-peptide <222> (58)...(414) <223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humaniz ed H chain V region <400> 83 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48 Met Lys Cys Ser Trp Val IIe Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-10

-5

-15

gtt	aac	tca	cag	gtg	cag	ctg	ttg	gag	tct	gga	gct	gtg	ctg	gca	agg	96
Val	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	
			1				5					10				
cct	ggg	act	tcc	gtg	aag	atc	tcc	tgc	aag	gct	tcc	gga	ttc	aac	att	144
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	He	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	lle	
	15					20					25					
aaa	gac	tac	tat	atg	cat	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	192
Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
30					35					40					45	
gag	tgg	att	gga	ggg	aat	gat	cct	gcg	aat	ggc	cat	agt	atg	tat	gac	240
Glu	Trp	lle	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	
				50					55					60	•	
ccg	aaa	ttc	cag	ggc	aga	gtc	acg	att	act	gcg	gac	gaa	tcc	acg	agc	288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	lle	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	
			65					70					75			
aca	gcc	tac	atg	gag	ctc	tcg	agt	ctg	aga	tct	gag	gac	tcg	gcc	gta	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
		80					85					90				
tat	ttc	tgt	gcg	aga	gac	tcg	ggc	tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa	384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
	95					100					105					
ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc							414
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser							
110					115											
210	> 8	4														
211	> 1	19														
212	> P	RT														

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of version "d3" of humanized H chain V region

<400> 84

1

Gin Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

5

20

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gin Gly Arg Val Thr lie Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 85

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector Lv1S

6 7 / 1 0 9

<400>	85	
gtctag	gatet ccaccatgag ggcccctgct cagttttttg ggatettgtt getetggttt	60
ccaggg	gatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc	98
<210>	86	
<211>	98	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	FR shuffling vector h5Lv4S	
<400>	86	
t t ggca	gatg gggtcccatc aaggttcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc	60
accato	ctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta	98
<210>	87	
<211>	98	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	FR shuffling vector h5Lv2A	
<400>	87	
cttaag	aagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca	60
gatgca	gaca gggaggatgg agactgggtc atctggat	98
<210>	88	
<211>	98	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		

<223> FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 88	
gatgggaccc catctgccaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct	60
ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc	98
<210> 89	
⟨211⟩ 94	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> FR shuffling vector h5Lv5A	
<400> 89	
tgttcgtacg tttgatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat	60
gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg	94
⟨210⟩ 90	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Primer h5LvS	
<400> 90	
gtctagatct ccaccatgag	20
<210> 91	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer h5LvA	
<400> 91	

```
tgttcgtacg tttgatctc
                                                                  19
<210> 92
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)...(60)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (61)...(381)
<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanize
d L chain V region
<400> 92
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca
                                                                  48
Met Arg Ala Pro Ala Gin Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20
                    -15
                                       -10
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct
                                                                96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                  1
                                 5
                                                   10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac
                                                                 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr lle Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
         15
                            20
                                               25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct
                                                                192
lle Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
     30
                        35
                                           40
```

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240 Lys Leu Leu lle Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser 45 50 55 60 288 agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 65 70 75 agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt 336 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly 85 90 gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lle Lys 95 100 105 <210> 93 <211> 107 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "a" of humanized L chai n V region <400> 93 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15 Asp Arg Val Thr lle Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp lle Lys Ser Phe 20 25 30 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu IIe 35 40 45

lyr	iyr	Ala	ınr	Ser	Leu	Ala	Asp	ыу	vai	Pro	Ser	Arg	rne	Ser	ыу	
	50					5 5					60					
Ser (Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	He	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	
Glu /	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Gly	Glu	Ser	Pro	Tyr	
				85					90					95		
Thr I	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	lle	Lys						
			100					105								
<210	> 9	4														
<211	> 7	7														
<212	> D	NA														
<213	> A	rti	fici	ial	Seq	uen	се									
<220	>															
<223	> F	R s	hufí	flin	g p	rim	er F	388								
<400	> 9	4														
gtctg	ggta	CC E	gatta	cact	tc to	cacca	tct	c gạg	gccto	cag	ccts	gaaga	itt	ttgca	actt	a 60
ctati	tgto	ctg (agaa	ıca												77
<210	> 9	5														
<211	> 7	7							•							
<212	> D	NA														
<213	> A	rti	fici	a l	Seq	uen	ce									
<220	>															
<223	> F	R s	huff	lin	g p	rime	er F	3SA								
<400	> 9	5														
tgtto	ctgo	ag a	caat	agta	a gi	tgca	iaaa	t ctt	cagg	ctg	gagg	ctcg	gag a	ıtggt	gaga	g 60
tgtaa	atcg	gt a	ccag	gac												77
<210	> 9	6												•		

```
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FR shuffling primer F3RS
<400> 96
gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta
                                                            60
                                                             77
ctattgtctg cagaaca
<210> 97
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FR shuffling primer F3RA
<400> 97
tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
                                                             77
tgtaatcggt accagac
<210> 98
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
(220)
<221> sig-peptide
⟨222⟩ (1)...(60)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (61)...(381)
```

<223	> N	ucle	oti	dе	sequ	ı e n c	e c	od i	ng f	0 r	ver	sion	u "b	" 0	f h	umanize
d L	cha	in V	/ re	gio	n											
< 400	> 9	8														
atg	agg	gcc	cct	gct	cag	ttt	ttt	ggg	atc	ttg	ttg	ctc	tgg	ttt	cca	48
Met	Arg	Ala	Pro	Ala	Gln	Phe	Phe	Gly	He	Leu	Leu	Leu	Trp	Phe	Pro	
-20					-15					-10					-5	
ggg	atc	cga	tgt	gac	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tcc	tcc	ctg	tct	96
Gly	lle	Arg	Cys	Asp	lle	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
				1				5					10			
gca	tct	gta	gga	gac	aga	gtc	acc	atc	acg	tgc	aag	gcc	t ca	cag	gac	144
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	He	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	
		15					20					25				
att	aaa	agc	ttc	tta	agt	tgg	tat	cag	cag	aaa	cca	ggg	aaa	gcc	cct	192
He	Lys	Ser	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	
	30					35					40					
aag	ctc	ctg	atc	tat	tat	gca	act	agt	ttg	gca	gat	ggg	gtc	cca	tca	240
Lys	Leu	Leu	He	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	•
45					50					55					60	1
agg	ttc	agt	ggc	tcc	gga	tct	ggt	acc	gat	tac	act	ctc	acc	atc	tcg	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	lle	Ser	•
				65					70					75		
ago	cto	cag	cct	gaa	gat	ttt	gca	act	tac	tat	tgt	ctg	cag	cat	ggt	336
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	. Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Gly	1
			80					85					90			
gag	ago	ccg	tac	acg	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	gtg	gag	atc	aaa		381
Glu	ser Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	He	Lys		
		95					100)				105				

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

⟨220⟩

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chai

n V region

<400> 99

Asp lle Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lle Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp lle Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lle Lys

100 105

<210> 100

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

```
<221> sig-peptide
<222> (1)...(60)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (61)...(381)
<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanize
d L chain V region
<400> 100
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca
                                                                    48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20
                    -15
                                        -10
                                                            -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct
                                                                    96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                  1
                                  5
                                                     10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac
                                                                   144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
         15
                             20
                                                 25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct
                                                                  192
lle Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
     30
                         35
                                             40
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca
                                                                  240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 45
                     50
                                         55
                                                            60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg
                                                                  288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
                 65
                                                        75
                                     70
```

age etc cag ect gaa gat att gea act tae tat tgt etg eag eat ggt 336 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly 80 85 90 gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lle Lys 95 100 105 <210> 101 <211> 107 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chai n V region <400> 101 Asp lle Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe 20 25 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr lle Ser Ser Leu Gln Pro 70 65 75 80 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

90

95

85

Thr Ph	ne Gly Gly Gly Thr Lys Val	Glu lle Lys			
	100	105			
<210>	102				
<211>	72				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR shuffling primer F	F2SS			
<400>	102				
gtctct	taag tiggticcag cagaaacca	g ggaaatctcc	taagaccctg	atctactatg	60
caacta	igtaa ca				72
<210>	103				
<211>	72				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR shuffling primer F	F2SA			
<400>	103				
tgttad	ctagt tgcatagtag atcagggtc	t taggagattt	ccctggtttc	tgctggaacc	60
aactta	nagag ac				72
<210>	104				
<211>	72				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	FR shuffling primer I	F2XS			
<400>	104				

```
gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtccctg atctattatg
                                                              60
caactagtaa ca
                                                              72
<210> 105
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
⟨220⟩
<223> FR shuffling primer F2XA
<400> 105
tgttactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctggtttc tgctgatacc 60
aacttaagag ac
                                                              72
<210> 106
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> sig-peptide
⟨222⟩ (1)...(60)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (61)...(381)
<223 Nucleotide sequence coding for version "b1" of humaniz
ed L chain V region
<400> 106
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca
                                                              48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20
                   -15
                                     -10
                                                       -5
```

ggg	atc	cga	tgt	gac	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tcc	tcc	ctg	tct	96
Gly	He	Arg	Cys	Asp	He	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
				1				5					10			
gca	tct	gta	gga	gac	aga	gtc	acc	atc	acg	tgc	aag	gcc	tca	cag	gac	144
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	He	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	
		15					20					25				
att	aaa	agc	ttc	tta	agt	tgg	ttc	cag	cag	aaa	cca	ggg	aaa	tct	cct	192
He	Lys	Ser	Phe	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	
	30					35					40					
		ctg														240
Lys	Thr	Leu	lle	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	
45					50					55					60	
agg	ttc	agt	ggc	tcc	gga	tct	ggt	acc	gat	tac	act	ctc	acc	atc	tcg	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	He	Ser	
				65					70				•	75		
		cag														336
Ser	Leu	Gln		Glu	Asp	Phe	Ala		Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Gly	
			80					85					90			
		ccg														381
Glu	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly		Gly	Thr	Lys	Val		lle	Lys		
		95					100					105				
<210																
<211																
<212																
	<213> Artificial Sequence															
<220																
<223	> A	mine	ac	i d	sequ	uenc	e o	f v	ers	ion	"b1	" 0	f hu	man	ized	L ch

in V region

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 . 25 . 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

5 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 108

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humaniz

e	d l	L cl	nain	V	reg	ion											
< 4	400	0 > 1	801														
a	tg	agg	gcc	cct	gct	cag	ttt	ttt	ggg	atc	ttg	ttg	ctc	tgg	ttt	cca	48
M	le t	Arg	Ala	Pro	Ala	Gln	Phe	Phe	Gly	Ile	Leu	Leu	Leu	Trp	Phe	Pro	
-	20					-15					-10					-5	
g	gg	atc	cga	tgt	gac	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tcc	tcc	ctg	tct	96
G	l y	lle	Arg	Cys	Asp	He	Gln	Met	Thr	GIn	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
					1				5					10			
g	ca	tct	gta	gga	gac	aga	gtc	acc	atc	acg	tgc	aag	gcc	tca	cag	gac	144
A	la	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	lle	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	
			15					20					25				
a	t t	aaa	agc	ttc	tta	agt	tgg	tat	cag	cag	aaa	cca	gag	aaa	gcc	cct	192
I	l e	Lys	Ser	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	
		30					35					40					
aa	ag	tcc	ctg	atc	tat	tat	gca	act	agt	ttg	gca	gat	ggg	gtc	cca	t ca	240
L	ys	Ser	Leu	He	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	
4	15					50					55					60	
aį	gg	ttc	agt	ggc	tcc	gga	tct	ggt	acc	gat	tac	act	ctc	acc	atc	tcg	288
Αı	g	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	lle	Ser	
					65					70					75		
ag	gC	ctc	cag	cct	gaa	gat	ttt	gca	act	tac	tat	tgt	ctg	cag	cat	ggt	336
Se	er	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Gly	
				80	•				85					90			
ga	ıg	agc	ccg	tac	acg	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	gtg	gag	atc	aaa		381
Gl	u	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	He	Lys		

<210> 109

95

105

100

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of version "b2" of humanized L cha in V region

<400> 109

Asp IIe Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanize

d H chain V region

<400> 110

Gin Val Gin Leu Leu Giu Ser Giy Ala Val Leu Ala Arg Pro Giy Thr

5

10

. 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20

25

30

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

⟨220⟩

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "a" to "j" of h umanized H chain V region

<400> 111

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

5

10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b1" and "d1" of humanized H chain V region

<400> 112

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

5

10

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b3" and "d3" of humanized H chain V region

<400> 113

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

10

<210> 114

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

5

(220)

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized H chain V region

<400> 114

Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu

5

10

15

Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions (b), (b1) and (

8 5 / 1 0 9

b3) of humanized H chain V region

5

<400> 115

Arg Val Thr lie Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized H chain V region

<400> 116

Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions "d", "d1" and "

d3" of humanized H chain V region

<400> 117

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "e" of humanized H chain V region

<400> 118

Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 119

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 Amino acid sequence of FR3 of version "f" of humanized H chain V region

<400> 119

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 20 25 30 <210> 120 <211> 32 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of FR3 of version "g" of humanized H chain V region <400> 120 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 5 10 15 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg 20 25 30 <210> 121 <211> 32 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of FR3 of version "h" of humanized H chain V region <400> 121 Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln 5 10 15 Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg 20 25 30 <210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "i" of humanized H chain V region

<400> 122

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of FR3 of version "j" of humanized H chain V region

<400> 123

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanize d H chain V region

10

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanize d L chain V region

<400> 125

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 126

⟨211⟩ 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of FR2 of versions "a", "b" and "c" of humanized L chain V region

<400> 126

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 5 10 15 <210> 127 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> Amino acid sequence of FR2 of version "b1" of humanize d L chain V region <400> 127 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu lle Tyr 5 10 15 <210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of version "b2" of humanize

d L chain V region

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized L chain V region

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

10

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of FR3 of versions "b", "b1" and "b2" of humanized L chain V region

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5 10

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 131

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223 > Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized L chain V region

<400> 131

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

 $\langle 223 \rangle$ Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanize d L chain V region

<400> 132

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu lle Lys

5

10

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humaniz ed H chain V region

<400> 133

Asp Tyr Tyr Met His

5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

9 3 / 1 0 9

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humaniz ed H chain V region

<400> 134

Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humaniz ed H chain V region

<400> 135

Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

5

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humaniz ed L chain V region

<400> 136

Lys Ala Ser Gln Asp lle Lys Ser Phe Leu Ser

5

10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humaniz

ed L chain V region

<400> 137

Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humaniz

ed L chain V region

<400> 138

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

5

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-2

<400> 139

Glu lle Gln Leu Gln Gin Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-3

<400> 140

Glu lle Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr 20 25 30 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe 70 75 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110 Thr Leu Thr Val Ser Ser 115 <210> 141 <211> 117 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-4 <400> 141 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala 5 10 15

Leu Vai Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe 55 60 Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser 115 <210> 142 <211> 117 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-5 <400> 142 Glu Val Gln Leu Gln Gin Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala 5 10 15 Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr 70 65 75 80 Leu Gin Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys 85 90 95 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser 115 <210> 143 <211> 118 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-7 <400> 143 Asp lle Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser 5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr 20 25 30 Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile 35 40 45

Gly Tyr lle Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe 55 60 50 Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe 70 75 65 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110 Leu Val Thr Val Ser Ala 115 <210> 144 <211> 118 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-8 <400> 144 Asp lle Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr 20 25 30 Asn lle Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp lle 35 40 45 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe 70 65 75 80 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110 Leu Val Thr Val Ser Ala 115 <210> 145 <211> 107 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-2 <400> 145 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly 5 10 15 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp 20 25 30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu IIe 35 40 45 Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala 65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr 85 90 95 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 <210> 146 <211> 107 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-3 <400> 146 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly 5 10 15 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp 20 25 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile 35 40 45 Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala 65 70 75 80 Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr 85 90 95

100 105

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-4

<400> 147

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45·

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou

1 0 3 / 1 0 9

se monoclonal antibody ATR-5 <400> 148 Asp lle Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly 10 . 5 15 Glu Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp lie Lys Ser Phe 20 25 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile 40 45 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser 65 70 75 80 Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr 85 90 95 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 <210> 149 <211> 112 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-7 <400> 149

10

15

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr lie Gly

5

Gin Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser 20 25 30 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser 35 40 45 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro 50 55 60 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp 85 90 95 Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110 <210> 150 <211> 112 <212> PRT <213> Mouse <220> <223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mou se monoclonal antibody ATR-8 <400> 150 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly 5 10 15 Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser 20 25 30 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro 55 50 60 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp 85 90 Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110 <210> 151 <211> 780 <212> DNA <213> Homosapiens <220> <223> DNA coding for soluble human TF <400> 151 atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48 Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val -30 -25 -20 gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96 Ala Arg Thr Leu Leu Cly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala -15 -10 -5 -1 tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser 1 5 10 15 act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192 Thr Asn Phe Lys Thr lle Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln 20 25 30

gto	tac	act	gtt	caa	ata	agc	act	aag	tca	gga	gat	tgg	aaa	ago	aaa	240
Val	Tyr	Thr	Val	Gln	lle	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	
		35					40					45	i			
tgc	ttt	tac	aca	aca	gac	aca	gag	tgt	gac	cto	acc	gac	gag	att	gtg	288
Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	He	Val	
	50					55					60					
aag	gat	gtg	aag	cag	acg	tac	ttg	gca	cgg	gtc	ttc	tcc	tac	ccg	gca	366
Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	
65					70					75					80	
ggg	aat	gtg	gag	agc	acc	ggt	tct	gct	ggg	gag	cct	ctg	tat	gag	aac	384
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	
				85					90					95		
tcc	cca	gag	ttc	aca	cct	tac	ctg	gag	aca	aac	ctc	gga	cag	cca	aca	432
Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	
			100					105					110			
att	cag	agt	ttt	gaa	cag	gtg	gga	aca	aaa	gtg	aat	gtg	acc	gta	gaa	480
lle	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	
		115					120					125				
gat	gaa	cgg	act	tta	gtc	aga	agg	aac	aac	act	ttc	cta	agc	ctc	cgg	528
Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	
	130					135					140					
gat	gtt	ttt	ggc	aag	gac	t ta	att	tat	aca	ctt	tat	tat	tgg	aaa	tct	576
Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	He	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	
145					150					155					160	
t ca	agt	tca	gga	aag	aaa	aca	gcc	aaa	aca	aac	act	aat	gag	ttt	ttg	624
Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	
				165					170					175		

att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg 672 lle Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val 180 185 190 att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720 lle Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu 195 200 205 tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat 768 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp 210 215 220 gac gat aaa taa 780 Asp Asp Lys 225 <210> 152 <211> 259 <212> PRT <220> <223 Amino acid sequence of soluble human TF <400> 152 Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val -30-25 -20 Ala Arg Thr Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala -15 -10 -5 -1 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser 1 5 10 15 Thr Asn Phe Lys Thr lle Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln 20 25 30

Val	Tyr	Thr	Val	Gln	lle	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys
		35					40)				45	ı		
Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	lle	· Val
	50					55					60				
Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala
65					70					75					80
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn
				85					90					95	
Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr
			100					105					110		
Пe	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu
		115					120					125			
Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg
	130					135					140				
Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	lle	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser
145					150					155					160
Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu
				165					170					175	
lle	Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Туг	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val
			180					185					190		
He	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu
		195					200					205			
Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp
	210					215					220				
Asp	Asp	Lys													
225	•														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP99/01768

	IFICATION OF SUBJECT MATTER C1 C12N15/13, C12P21/08, C12	N5/10						
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
	B. FIELDS SEARCHED							
	ocumentation searched (classification system followed C1 C12N15/13, C12P21/08, C12							
	ion searched other than minimum documentation to th							
	ata base consulted during the international search (nate of the line of the li		earch terms used)					
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.					
Y	WO, 96/40921, A1 (JOHNSON & 19 December, 1996 (19. 12. 9 & EP, 833911, A		1, 3, 33, 34, 49, 50, 53, 54, 65-68, 77-80					
Y	JP, 1-503438, A (SCRIPPS CLIFOUNDATION), 22 November, 1989 (22. 11. 8 & WO, 94/05328, A1 & US, 5 & US, 5223427, A & EP, 309 & US, 5437864, A	9) 110730, A	1, 3, 33, 34, 49,50,53,54, 65-68, 77-80					
A	JP, 4-505398, A (CELLTECH L'24 September, 1992 (24. 09. & WO, 91/09968, A1 & EP, 4 & EP, 460171, A & EP, 4601 & EP, 620276, A & EP, 6263 & WO, 91/09966, A1 & WO, 9 & JP, 4-506458, A & JP, 5-	92) 60167, A 78, A 90, A 1/09967, A1	1, 3, 33, 34, 49,50,53,54, 65-68, 77-80					
Further	documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.						
"A" documer consider documer cited to a special r documer means "P" documer the prior	categories of cited documents: nt defining the general state of the art which is not ed to be of particular relevance locument but published on or after the international filing date nt which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) nt referring to an oral disclosure, use, exhibition or other int published prior to the international filing date but later than rity date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family						
24 Ji	ctual completion of the international search une, 1999 (24. 06. 99)	Date of mailing of the international search report 6 July, 1999 (06. 07. 99)						
	ailing address of the ISA/ nese Patent Office	Authorized officer						
Facsimile No	o.	Telephone No.						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP99/01768

Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The technical matter in common in the present invention resides in a humanized antibody against human tissue factor. As the results of searching, however, it is clarified that the humanized antibody against human tissue factor is not a novel one since the literature WO, 96/40921 A (JOHNSON & JOHNSON), 19. December 1996 discloses the same. As a result, the humanized antibody against human tissue factor falls within the category of the prior art. Such being the case, this common matter (the humanized antibody against human tissue factor) cannot be regarded as a special technical matter in the meaning as defined in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT. Accordingly, there is no technical matter common to all claims. Since there is no other technical matter common thereto which is seemingly a special technical matter in the meaning as defined in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT, these inventions differing from each other do not have technical relevancy to each other as specified in Rule 13 of the Regulations under the PCT. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. X No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.; The international search report is established on a chimeric H chain wherein the H chain V region as set forth in claim 1 has the amino acid sequence representd by SEQ ID No:139; a chimeric antibody having this B chain; a DNA encoding this B chain; an expression vector containing this DNA; a host transformed by this expression vector; and a process for producing the above chimeric antibody. Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

			EMEMBER 1CI/JI9	3/01/08
A. 発明の	属する分野の分類(国際特許分類(IPC))			
Int. Cl°	C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10			
	行った分野 最小限資料(国際特許分類(IPC))			
Int. Cl ⁶	C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10			
最小限資料以外	外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用	用した電子データベース(データベースの名称、	、調査に	使用した用語)	
BIOSIS(DI	ALOG), WPI (DIALOG), GENESEQ, PIR, Swiss-Prot			
	ると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連する	ときは、	その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/40921, A1 (JOHNSON&JOHNSON) I 833911, A			1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
Y	JP, 1-503438, A (SCRIPPS CLINIC AND 月. 1989(22. 11. 89) & WO, 94/05328, A 5223427, A & EP, 309548, A & US, 5437	A1 & US	ARCH FOUNDATION) 22. 11 S, 5110730, A & US,	1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
A	JP, 4-505398, A (CELLTECH LTD.) 24.9 91/09968, A1 & EP, 460167, A & EP, 46 620276, A & EP, 626390, A & WO, 91/09 JP, 4-506458, A & JP, 5-500312, A	50171, <i>A</i>	A & EP, 460178, A & EP,	1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
□ C欄の続き	さにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別	紙を参照。
もの 「E」国際出席 以後にな 「L」優先権主 日若献(四 文献(四 「O」口頭によ	のカテゴリー 他のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 自日前の出願または特許であるが、国際出願日 公表されたもの と張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 は他の特別な理由を確立するために引用する 理由を付す) こる開示、使用、展示等に言及する文献 百日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	(T) (X) (X) (Y)	の日の後に公表された文献 国際出願日又は優先日後に公表さ て出願と矛盾するものではなく、 能の理解のために引用するもの 特に関連のある進歩性がないと考え の新規性又は進歩性がないと考え 特に関連のある文献であって、当 上の文献との、当業をと考えられる 同一パテントファミリー文献	発明の原理又は理 総文献のみで発明 られるもの 総文献と他の1以 間である組合せに
国際調査を完了	てした日 24.06.99	国際調	直報告の発送日 0 6. 07	.99
日本国	D名称及びあて先 同特許庁 (ISA/JP)	特許庁	審査官(権限のある職員) 滝本 晶子	4B 9452
	B便番号100-8915 B千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番	号 03-3581-1101	内線 3448

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)
法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。
1. 請求の範囲は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、
2. 計球の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に 従って記載されていない。
第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)
次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
本願発明において共通の事項は、け組織因子に対するth型化抗体である。 しかしながら、調査の結果、th組織因子に対するth型化抗体は、文献WO,96/40921,A(JOHNSON&JOHNSON),19.12月.1996に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。 結果として、th組織因子ない対するth型化抗体は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、この共通事項(th組織因子に対するth型化抗体)は特別な技術的事項でない。 それ故、請求の範囲の全てに共通の事項はない。 PCT規則13.2の第2文において特別な技術
的事項と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則1 3の意味における技術的な連関を見いだすことはできない。
1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求 の範囲について作成した。
2. 自加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. □ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. X 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1のH鎖V領域が配列番号:139のアミノ酸配列を有するキメラH鎖、及び該H鎖を有するキメラ抗体、該H鎖をコードするDNA、 該DNAを含む発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された宿主、該キメラ抗体の製造方法について国際調査報告を作成する。
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
□ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 □ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。